

THESIS

WÜRZBURG 1965

Aus der Universitäts-Kinderklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. J. Ströder

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT BESTIMMTER ENZYME
DER GLYKOLYSE IN ERYTHROZYTEN BEI EXPERIMEN-
TELLER RACHITIS

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hans-Olaf Gartzke
aus Würzburg

Würzburg 1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153518_0085

Aus der Universitäts-Kinderklinik Würzburg

Direktor: Professor Dr. J. Ströder

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AKTIVITÄT BESTIMMTER ENZYME
DER GLYKOLYSE IN ERYTHROZYTEN BEI EXPERIMEN-
TELLER RACHITIS

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Hans-Olaf Gartzke

aus Würzburg

Würzburg 1965

Referent: Professor Dr. med. J. Ströder

Tag der Promotion: **28. 7. 66**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Uni-
versität Würzburg

Für meine Eltern

und meine Frau

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der Abkürzungen

I. Einleitung	1
---------------	---

Theoretischer Teil

II. 1. Überblick über die bisher vorliegenden Ergebnisse von Untersuchungen bei Rachitis	3
2. Problemstellung der vorliegenden Arbeit	5

Praktischer Teil

III. 1. Blut als Untersuchungsmaterial	6
2. Messung von Enzymaktivitäten	8
3. Haltung und Behandlung der Versuchstiere	15
4. Methodik der Blutgewinnung und Blutaufarbeitung	17
5. Stoffwechselschemata mit Einordnung der unter- suchten Enzyme	20
6. Messungen, Ergebnisse und Tabellen außerhalb der Aktivitätsmessungen	25
a) Gewichtsentwicklung	25
b) Blutwerte der Versuchstiere	28
c) Röntgenkontrolle	32
IV. 1. Rechnerische Hilfsgrößen zur Berechnung der Enzymaktivitäten	33
2. Statistische Auswertung	37
V. 1. Der Hexokinase - Test	38
2. Der Glucose-6-phosphatdehydrogenase - Test	45
3. Der Aldolase - Test	51
4. Der Triosephosphatisomerase - Test	57
5. Der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase - Test	63
a) unter Zusatz von reduziertem Glutathion	64
b) ohne Zusatz von reduziertem Glutathion	69

VI. Zusammenstellung der Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen	74
VII. Diskussion	77
VIII. Zusammenfassung und Ergebnis	81
IX. Literaturverzeichnis	I - V

ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ALD	Aldolase
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
DOAP	" "
1, 3-DPG	1, 3-Diphosphoglycerat
2, 3-DPG	2, 3-Diphosphoglycerat
DPN ⁺	Diphosphopyridinnucleotid
DPNH	Diphosphopyridinnucleotid reduziert
E.	Enzym
Δ E	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FDP	Fructose-1, 6-diphosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
GAP	Glycerinaldehydphosphat statt GA-3-P
GA-3-P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDH	Glycerin-1-phosphatdehydrogenase
α -GP	α - Glycerophosphat
GSH	Glutathion reduziert
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-PDH	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
Hb	Hämoglobin
HK	Hexokinase
I. E.	Internationale Einheit
LDH	Lactatdehydrogenase
M. E.	Milli-Einheit
MethHb	Methämoglobin
MeE	Methylenblau
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
"p"	Integral von Unendlich bis "t"
3-PG	3- Phosphoglycerat
6-PG	6- Phosphogluconat
2, 3-PGA-ase	2, 3-Glycerinaldehydphosphatase

6-PGD	6-Phosphogluconatdehydrogenase
PGK	Phosphoglyceratkinase
S.	Substrat
s	Standardabweichung
$s_{\bar{x}}$	Standardabweichung des Mittelwertes
SH - Gruppe	Sulphydryl-Gruppe
SP	Serumphosphat
"t"	Signifikanzschränke im "t-Test" nach STUDENT
TIM	Triosephosphatisomerase
TPE	Triosephosphatester
TPN ⁺	Triphosphopyridinnucleotid
TPNH	Triphosphopyridinnucleotid reduziert
TRAP	Triäthanolaminpuffer
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan - Puffer
$\bar{x}$	Mittelwert
ZF	Zwischenferment = G-6-PDH

E I N L E I T U N G

Das Krankheitsbild der Rachitis ist seit dem Altertum bekannt. Berühmt ist ihre Beschreibung durch GLISSON (Arzt in London 1597-1677). Es vergingen aber zweieinhalb Jahrhunderte bis im Jahre 1919 HULDSCHINSKY eine Behandlungsmöglichkeit durch UV-Licht-Bestrahlung und RADZINSKI 1922 einen Zusammenhang mit der Sonnenlichteinstrahlung angaben. Ein weiterer Fortschritt war es, als HESS und STEENPOCK fanden, daß eine Bestrahlung von Nahrungsmitteln ebenfalls antirachitische Wirkung hervorruft. Nachdem die Sterine der Nahrung als die Stoffe erkannt worden waren, welche durch Lichtenergie aktiviert werden, war der Avitaminosecharakter der Krankheit offenbar. Es gelang schließlich das Ergosterin als die Stammsubstanz der offensichtlich antirachitischen Stoffe zu identifizieren. Die chemische Aufklärung dieser Substanzen ist WINDAUS gelungen.

Die Bemühungen um die Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Vitamin D als der antirachitisch wirksamen Substanz haben bis heute zu keinem Ergebnis geführt. Insbesondere ist die Wirkung im molekularen Bereich völlig unbekannt, während andere, zum Teil später erkannte Vitamine als Coenzyme oder deren Vorstufen erklärt werden können (z. B. die Vitamine B₁, E₂ und B₆).

Von den Untersuchungen der letzten Jahre scheinen die Befunde von SCHACHTER und Mitarbeitern (58, 37) über die Wirkung des Vitamin D auf die Resorption von Calcium im Darmpräparat einen Hinweis zu geben. Es wurde nämlich gezeigt, daß nach Gabe von Vitamin D bei rachitischen Tieren die verlorene Fähigkeit restituiert wird, einen Konzentrationsgradienten für Calciumionen vom Darmlumen durch die Mucosazelle oder deren Mitbeteiligung zum Körper hin aufzubauen. Da bei diesen Versuchen zur Erzielung einer Resorptionsteigerung das Vitamin einige Stunden vor dem Versuch an die Tiere verabreicht werden mußte, bleibt die Unge-
wißheit, ob das Vitamin D seine Wirkung direkt in der Mucosazelle aus-

übt, oder ob die gefundene Veränderung der Mukosa für die Calzium-resorption sekundär auf unbekannten Wegen vor sich geht. Auch bei der Verteilungsmessung von radioaktiv-markiertem Vitamin D fanden KODICEK (34) wie auch AEEI (1) die größte Aktivität im Bereich der Leber, während in der Darmschleimhaut erst nach Tagen eine Radioaktivität nachgewiesen wurde, obwohl nach SCHACHTER (58, 37) die Wirkung auf die Calziumresorption bereits nach Stunden nachweisbar ist.

Es bleibt daher bei dem gegenwärtigen Stand des Wissens die Notwendigkeit, weiter nach pathologischen Veränderungen und deren Ursachen im rachitischen Organismus zu suchen, um weitere Zusammenhänge aufzudecken.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Veränderungen von Enzymaktivitäten der Erythrozyten rachitischer Ratten.

Überblick über die bisherigen Ergebnisse

Bei der Rachitis gehen Hand in Hand mit den morphologischen Veränderungen am Skelettsystem blutchemische Veränderungen. Somit ist klar, daß ein von der Rachitis befallener Organismus eine Änderung des "Milieu intérieur" entwickelt, welche ihrerseits wiederum mannigfache Auswirkungen auf die Stoffwechselfunktionen des betroffenen Körpers hat, sodaß die Rachitis im wahren Sinn eine Allgemeinkrankheit des Körpers ist, STRÖDER (61).

Am auffallendsten ist eine Änderung der Konzentrationen von Calcium und Phosphat im Serum, IVERSEN-LENSTRUP 1919 (31). Während normalerweise die Relation von Calcium zu Phosphat etwa 2:1 ist, ist sie bei der Rachitis bis zum Verhältnis 4:1 verschoben (17). So ist auch das "Leitsymptom" der Rachitis, welches allen anderen Stoffwechselveränderungen voraus-eilt, eine Hypophosphatämie (29).

Eine Erhöhung der "Alkalischen Phosphatase" im Serum von Rachitiskranken wird von ROBISON und DOOSE (56, 22) beschrieben.

1925 hat LANDSBERGER (38) eine Ketonurie beobachtet.

Die von mehreren Autoren (4, 45) beschriebene Grundumsatzherabsetzung (gemessen am Sauerstoffverbrauch) konnte BIERMANN (10) nicht bestätigen.

JONXIS (32) berichtet, daß je nach Ausprägung der Rachitis eine mehr oder weniger starke Aminoacidurie bestehe.

Wegweisend für neuere Untersuchungen war die Entdeckung von FREUDENBERG und WELCKER (24) bzw. BROCK und WELCKER (15) daß der Glucoseumsatz von Erythrozyten rachitischer Kinder in vitro inkubiert, gehemmt bis aufgehoben erscheint.

1939 fanden RAPOPORT und GUEST (54, 55) das sogenannte "7 - Minutenphosphat" und das 2,3-Diphosphoglycerat in Erythrozyten rachitischer Körper herabgesetzt.

1960 beschreibt WILHELM (70) eine Erniedrigung von ATP sowohl in der Leber, den Nieren und Muskeln als auch in den Erythrozyten rachitischer Ratten.

Eine Erniedrigung der Citratkonzentration bei Rachitis in Blut, Herz, Niere, Darm und Knochen wurde von HARRISON (28) sowie von STEENBOCK und BELLIN (60) beschrieben.

1963 berichten STRÖDER und GARBE (25) über einen Anstieg der glykolytischen Intermediärprodukte Fructose-1,6-Diphosphat und Triosephosphat in Erythrozyten rachitischer Ratten. Ferner wird hier eine nicht kompensierte Acidose infolge eines Anstieges des Metaboliten Lactat beschrieben.

Neueste Untersuchungen erbrachten eine Verminderung des wichtigsten Muskeleiweißes, des Actomyosins, STRÖDER und ARENSMEYER (3), sowie eine Herabsetzung des sogenannten "wahren Phosphates" im Lebergewebe und in der Muskulatur rachitischer Ratten, STRÖDER, GARBE, KOLB und HANOWSKY (35, 27). Weiter fanden STRÖDER und GARBE (26) eine verminderte mittlere Lebensdauer der Erythrozyten rachitischer Tiere.

Problemstellung der vorliegenden Arbeit

Aus den bisher vorliegenden Befunden über Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel der Erythrozyten rachitischer Ratten ergab sich die Problemstellung dieser Arbeit:

Veränderungen im Gehalt von Zwischenprodukten des Stoffwechsels wie sie hier bei der Rachitis für ATP und 2,3-DPG sowie für FDP und Triosephosphat gefunden wurden, lassen sich auf zwei prinzipiell verschiedene Ursachen zurückführen:

1. Das Zusammenspiel der an der Reaktionskette des Stoffwechsels teilnehmenden Substrate wird durch den Mangel von einem einzigen gestört, sodaß sich Zwischenstoffe anstauen, die mit dem fehlenden Substrat weiter umgesetzt würden. Ein häufig zu beobachtendes Beispiel ist die Anhäufung von Lactat bei Sauerstoffmangel. Bei der Rachitis ist in diesem Zusammenhang an einen Mangel von Phosphat zu denken, sodaß man einen Anstau solcher Intermediärprodukte erwarten kann, die mit Orthophosphat weiter umgesetzt werden.
2. Es kann jedoch auch ein die Reaktion katalysierendes Enzym in seiner Aktivität abnehmen, wodurch die Umsatzrate herabgesetzt wird. Dadurch kann ebenfalls ein Substratanstau resultieren. Als Beispiele sind angeborene Enzymdefekte bekannt. Bei der Galaktosämie - einem vollständigen Fehlen der Uridyldiphosphatglucose-Transferase findet man einen Anstau von Galaktose-1-phosphat und bei der Fructose - Intolleranz einen Anstau von Fructose-1-phosphat.

In dieser Arbeit sollte die Aktivität derjenigen Fermente in den Erythrozyten bestimmt werden, die für die Veränderungen der genannten Zwischenstoffkonzentrationen verantwortlich sein könnten.

Es werden die Enzyme Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, Aldolase, Triosephosphatisomerase und Glycerinaldehyd-Dehydrogenase in Form der Aktivitätsbestimmung mit Hilfe des sogenannten optischen Tests nach WARBURG (66) bestimmt.

Blut als Untersuchungsmaterial

Das Blut nimmt im lebenden Organismus eine ganz besondere Stellung ein. Es erfüllt nicht nur mit seinen differenzierten Zellelementen die Aufgaben des Gastransportes, der Infektabwehr und der Blutgerinnung, des weiteren die mannigfachen Transportfunktionen von Nährstoffen, Hormonen, von Wärme und Abbauprodukten des Körpers, sondern es verknüpft auch damit, gemeinsam mit dem nervösen System die Vielzahl der Organe zur höheren Ordnung, zum Organismus.

So wird augenscheinlich, daß eine Veränderung in der Zusammensetzung der Blutflüssigkeit, welche im gesunden Körper als biologische Konstante angesehen werden darf, zwangsläufig Disregulation in den geordneten Ablauf der Lebensfunktionen bringt, was Krankheit des gesamten Organismus bedeutet.

Die Erythrozyten erfüllen die Aufgabe des Sauerstofftransportes, da nur ein kleiner Teil des eingeatmeten Sauerstoffes physikalisch im Blut gelöst ist. Zu diesem Zweck sind sie im Sinn der dichtesten Packung mit dem sauerstoffbindenden Hämoglobin angefüllt, sodaß sie zu 4/5 ihrer Trockensubstanz aus Hämoglobin bestehen. Da die Erythrozyten jedoch keinen Kern haben, ist ihnen die Möglichkeit zu Synthesen genommen, woraus sich zwangsläufig eine beschränkte Lebensdauer ergibt, welche durch die Alterung der Zellfermente bestimmt sein dürfte, LÖHR und WALLER (41).

Die Energie für ihren Leistungs- und Erhaltungsstoffwechsel gewinnen die Erythrozyten aus der Glykolyse. Dabei wird die Glukose über eine Vielzahl von einzelnen Reaktionen zu Lactat abgebaut. Die freiwerdende Energie erscheint in der "energiereichen Phosphat-Bindung" des gebildeten ATP. WARBURG macht einen zu niedrigen intrazellulären ATP-gehalt für einen vorzeitigen Zellzerfall verantwortlich. Es könnten daher

1. eine genetisch bedingte Stoffwechselanomalie, ein "inborn error of metabolism", wie das Fehlen eines bestimmten Fermentes,

2. eine Veränderung der Zusammensetzung der Blutflüssigkeit, in deren Gefolge eine Änderung des intrazellulären Milieus denkbar ist, und
3. eine ungenügende Ausreifung und daher eine geringere und eventuell minderwertigere Enzymausstattung mit möglicherweise einhergehender Membranveränderung

eine Änderung der Stoffwechsellage in den Erythrozyten hervorrufen, wodurch sich ein etwa stattfindender vorzeitiger Erythrozytenabbau erklären ließe.

Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, daß der Kohlehydratstoffwechsel in den Erythrozyten rachitischer Lebewesen gestört und die mittlere Lebensdauer der roten Blutkörperchen verkürzt sind (70, 25, 26, 46).

Messung von Enzymaktivitäten

Die Fermente, welche durch ihre Eigenschaft als Biokatalysatoren selektiv und meist substratspezifisch den Intermediärstoffwechsel steuern, sind mit diesen Eigenschaften die Werkzeuge des Lebens schlechthin.

Die Enzyme sind in Reaktionsketten zu Systemen verbunden. So erklärt sich, daß eine Störung in der Umsatzgröße, das ist die Aktivität eines Enzyms, oder gar das Fehlen eines Fermentes infolge eines anlagemäßigen Defektes, eine Störung in der Reaktionskette des gesamten Intermediärstoffwechsels hervorrufen kann. Daher ist die Messung von Enzymaktivitäten von besonderer diagnostischer und wissenschaftlicher Bedeutung.

Die Grundlagen für streng spezifische Mikromethoden zur Bestimmung auch kleinster Enzymmengen hat der "optische Test" nach WARBURG (66, 67) gegeben.

Er beruht auf der Tatsache, daß viele Fermentreaktionen unter Beteiligung stöchiometrischer Mengen bestimmter Coenzyme ablaufen. Von diesen haben das DPN und das TPN im ultravioletten Bereich des Lichtes ganz charakteristische Absorptionsspektren. Da die Coenzyme in molaren Verhältnissen an den ablaufenden Reaktionen beteiligt sind, ergibt sich aus der Messung der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit ein exaktes Maß für die ablaufende Reduzierung oder Oxydierung des beteiligten Coenzym und damit eine Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung von Substraten und die Aktivitätsbestimmung von Enzymen. Durch den Einsatz sehr reiner Substrate ist es auch möglich, in einem Gemisch von Enzymen wie man es bei Zellhomogenaten oder im Hämolysat erhält, ganz bestimmte Enzyme zu erfassen.

Der Substratumsatz der Enzyme ist stark abhängig von Temperatur und p_H - Wert des Milieus. Alle Messungen von Enzymaktivitäten müssen daher gemäß der Definition der Enzymeinheit bei konstanter Temperatur und konstantem p_H durchgeführt werden, was durch Thermostatierung und Verwendung von Puffersystemen erreicht wird.

Auch die einfachste Enzymreaktion besteht aus einer Koppelung zweier Einzelschritte: einmal der Bildung des Enzym-Substrat - Komplexes ES aus dem Enzym E und dem Substrat S, zweitens aus dem Zerfall dieses Adduktes unter Rückbildung des Enzyms E und der Entstehung des Reaktionsproduktes P.



Die Reaktionsgeschwindigkeit, und damit die Enzymaktivität, wird im Zustand des "steady state" gemessen. Unter "steady state" versteht man eine stationäre, optimale Konzentration des Komplexes ES, welche die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, das heißt die maximale Bildung des Produktes P ermöglicht.

Enzyme aktivieren also ihre Substrate durch die Bildung eines Substrat - Enzym - Komplexes, wodurch die Substrate erst reaktionsfähig werden. Demnach wird die maximale Geschwindigkeit einer Enzymreaktion in einem Reaktionsraum bei Absättigung des Fermentes mit Substrat erreicht sein. Jedoch ist bei einigen Enzymen eine Hemmung der Aktivität bei Übersättigung mit Substrat zu beobachten, sodaß eine optimale Substratkonzentration eingehalten werden muß.

Neben der einfachen Reaktion, die sich direkt im optischen Test verfolgen läßt, benützt man auch gekoppelte Reaktionen, bei denen an die gewünschte Reaktion eine DPN- oder TPN-abhängige Indikatorreaktion angeschlossen wird. Damit solche zusammengesetzten Reaktionen in ihrer Geschwindigkeit nur von der interessierenden Reaktion abhängig sind, ist ein sehr hoher Überschuß an Indikator-Enzym notwendig, BERGMEYER (8, 9).

Bei geeigneter Wahl der Testzusammensetzung entsprechend der Forderungen für Enzymreaktionen zeigt die graphische Darstellung einer Fermentreaktion anhand der Extinktionsänderung in der Zeiteinheit eine Gerade, die einem konstanten "steady state" entspricht. Dieser geradlinige Verlauf

erlaubt es mit "fliegendem Start" zu arbeiten und bei genügender Sicherheit des Reaktionsablaufes nur eine Teilstrecke auszuwerten.

Dagegen lassen unerwartete Schwankungen und Abweichungen von dem zu fordernden geradlinigen Verlauf auf Verunreinigungen, nicht spezifische Testzusammensetzungen, Unreinheiten der Testsubstanzen und daher mitlaufende Reaktionen schließen, welche zeitlich unregelmässige Extinktionsänderungen verursachen können.

Am besten lassen sich extinktionsändernde Enzymreaktionen mit einem an ein Photometer gekoppelten Extinktionsschreiber verfolgen, zumal irgendeine Störung und damit Veränderung des Kurvenverlaufes sofort beobachtet werden kann. Ferner ist die Auswertung zuverlässig im geradlinigen Teil der Reaktionskurve möglich.

Für die in dieser Arbeit dargelegten Messungen wurde ein Spektralphotometer "Eppendorf" mit gekoppeltem Extinktionsschreiber verwendet.

Die benützten, gegeneinander ausgemessenen OS-Küvetten mit der Schichtdicke 1 cm wurden mit einem der üblichen thermostatgesteuerten Temperieraggregate auf konstanter Temperatur gehalten.

Alle Reaktionen wurden bei 25°C und der Wellenlänge 366 m μ des Quecksilberlampenspektrums gemessen. Der p_H - Wert des jeweiligen Puffers wird bei den Testzusammensetzungen angegeben.

Die für die Aktivitätsbestimmung benötigte Bestimmung der Extinktionsänderung ist mit der Lichtdurchlässigkeit einer Lösung, welche ihrerseits von der Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes abhängt, in gesetzmässiger Weise verknüpft. Ein Maß für die Durchlässigkeit ist der Quotient

$$\frac{I}{I_0}$$

für die Extinktion gilt:

$$\text{Extinktion} = \log \frac{1}{\text{Durchlässigkeit}}$$

$$\Delta E = \log \frac{I_0}{I}$$

Die Extinktionsmessungen gehorchen dem LAMBERT - BEER' schen Gesetz:

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Hierbei sind:

- I_0 = Intensität des in die Messküvette eingestrahnten Lichtes
 I = Intensität des aus der Messküvette austretenden Lichtes
 ϵ = molarer Extinktionskoeffizient bei der verwendeten Wellenlänge mit der Dimension $\left[\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}} \right]$
 c = Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes $\left[\frac{\text{Mol}}{\text{ml}} \right]$
 d = Schichtdicke des Innenraumes der Messküvette $\left[\text{cm} \right]$

In den Versuchen wurde $d = 1\text{cm}$ gewählt. Der molare Extinktionskoeffizient von TPN bzw DPN bei der benützten Wellenlänge von $366\text{ m}\mu$ beträgt

$$3,30 \cdot 10^6 \left[\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}} \right] \quad (33)$$

wobei es gleichgültig ist, ob die Coenzyme durch Wasserstoffaufnahme aus TPN bzw. DPN zu TPNH bzw. DPNH werden, oder ob die hydrierten Coenzyme Wasserstoff abgeben, da nur die Extinktionsänderung im genannten Wellenlängenbereich interessiert.

Die Enzym - Aktivität wird in Enzym - Einheiten gemessen. Bis zur Einführung einer "internationalen Einheit" (I. E.) herrschte eine gewisse Nomenklaturunsicherheit, da die verschiedenen Untersucher von verschiedenen Definitionen und Messmethoden ausgingen. Seit 1959 ist nach einem Vorschlag von RACKER u. a. (50) die internationale Enzymeinheit (I. U. E. - Einheit, I. U. L. = International Union of Biochemistry) eingeführt. Sie ist definiert als

die Enzymmenge, die 1 μ Mol Substrat pro Minute bei 25°C, optimaler Substratkonzentration, optimaler Ionenstärke des Puffers und optimalen p_H - Bereich, umsetzt.

Als Untereinheit wird 1 Millieinheit geführt:

$$1 \text{ I. E.} = 1000 \text{ M. I. E.}$$

Eine Enzym - Einheit entspricht also einem TPNH bzw. DPNH Umsatz von

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} = 1 \mu \text{ Mol}$$

in der Zeiteinheit.

Zur Umrechnung der einzelnen Enzym - Einheiten bietet sich eine Umrechnungstabelle an, wie sie sich bei BERGMEYER findet (9). Diese Tabelle ist folgend angegeben:

Definition und Umrechnungsfaktoren einiger Enzym-Einheiten

Zur Umrechnung einer Einheit nach	in eine Einheit nach	multiplizieren mit
IUB a) Millieinheiten/ml* 25° C; 1 µMol/min	Bücher et al.b) Wróblewski et al.c) Amelung u. Horn d) Bruns e) Holzer et al.; Gerlach f)	0,055 2,074 0,060 1,64 1,099
Bücher et al.b) 25° C, 1 ml, 100 sec; ΔE ³⁶⁶ =0,100	IUB a) Millieinheiten/ml* Wróblewski et al.c)	18,2 37,7
Wróblewski et al.c) 23° C**, 3 ml, 1 min; ΔE ³⁴⁰ =0,001	IUB a) Millieinheiten/ml* Bücher et al.b)	0,482 0,0265
Amelung u. Horn d) 25° C, 1 µMol/Std./ml	IUB a) Millieinheiten/ml* Bücher et al.b) Wróblewski et al.c) Bruns e)	16,7 0,92 34,6 54,6
Bruns e) 37° C*** 1 µl FDP/Std./ml	IUB a) Millieinheiten/ml* Bücher et al.b) Wróblewski et al.c) Amelung u. Horn d)	0,61 0,033 1,26 0,0183
Holzer et al.; Gerlach f) 24° C**, 3 ml, 1 min; ΔE ³⁶⁶ =0,001	IUB a) Millieinheiten/ml* Bücher et al.b) Wróblewski et al.c)	0,910 0,05 1,89

a) Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry (IUB) 1961, Symposium Series Vol. 20, Pergamon Press London 1961;
J. Cooper, P. A. Srere, M. Tabachnick u. E. Racker, Arch. Biochem. Biophysics **74**, 306 (1958); E. J. King u. D. A. Campbell, Clin. chim. Acta **6**, 300 (1961)

b) Z. Naturforsch. **8b**, 555 (1953)

c) Science (Washington) **120**, 3117 (1954)

d) Dtsch. med. Wschr. **81**, 1701 (1956)

e) Biochem. Z. **325**, 156 (1954)

f) Biochem. Z. **326**, 451 (1955)

Klin. Wschr. **35**, 1145 (1957)

* Gemäß IUB wird die „Internationale Enzym-Einheit“ definiert: 1 Einheit ist die Enzymmenge, die bei 25° C in 1 min 1 µMol Substrat/1000 ml umsetzt. 1 Millieinheit/ml = 1/1000 Einheit.

** Die Abweichung der Meßtemperatur von 25° C wurde für die Umrechnung nicht berücksichtigt.

*** Die Abweichung der Meßtemperatur von 25° C wurde für die Umrechnung berücksichtigt.

Für Untersuchungen in biologischem Material, wie hier Erythrozyten experimentell rachitischer Ratten, ist es notwendig, geeignete Bezugseinheiten zu wählen, welche eine Objektivierung ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit werden deshalb die gefundenen Enzym - Aktivitäten

1. auf 10^{11} Erythrozyten in Anlehnung an ALTMAN (2) bzw.
2. auf 1 Milliliter Erythrozytenvolumen

umgerechnet. Letztere Umrechnung gewinnt an Bedeutung, da für rachitische Individuen Erythrozytenpopulationen diskutiert werden, bei denen der mittlere Durchmesser der Erythrozyten und damit das mittlere Volumen vergrößert sind (25, 26).

Die angeführten Bezugseinheiten lassen sich aus der Aufbereitungsmethodik und der Zusammensetzung des Testansatzes errechnen.

Die Messungen wurden unter Verwendung von Testsubstanzen und teilweiser Benützung der Testvorschriften der C. F. BOEHRINGER & SOEHNE GmbH Mannheim ausgeführt.

Um weitgehende Reproduzierbarkeit, Gleichmässigkeit und Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen zu erzielen, wurden standardisierte Konzentrationen der jeweils notwendigen Substanzen hergestellt. Als Lösungsmittel wurde in Quarz bidestilliertes Wasser verwendet. Um möglichst frische Lösungen zu haben, wurden sie alle 48 Stunden neu angesetzt.

Die jeweils verwendeten Lösungen werden im experimentellen Teil der Arbeit bei den Testansätzen mitgeteilt.

Haltung und Behandlung der Versuchstiere

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden ungefähr 80 Tiere verwendet. Die notwendigen Vorversuche wurden zum größten Teil mit Ratten aus dem Tierstall der Klinik ausgeführt. Die ausgewerteten Versuche wurden mit Ratten aus dem Untersuchungs- und Forschungsinstitut für Milchvitaminierung Frankfurt a. M. ⁺⁾ ausgeführt. Dabei wurden zwei Gruppen untersucht, von denen eine aus experimentell rachitischen Tieren, die andere aus mit Vitamin D geschützten, also gesunden Vergleichstieren bestand.

Es handelt sich bei den Tieren nach Auskunft des Frankfurter Institutes um "Giessener" und "Hallenser" Inzuchtstämme.

Die für die Untersuchungen bestimmten Jungtiere wurden im Alter von 3 Wochen von den Vitamin D-arm ernährten Muttertieren getrennt und mit einer Rachitis - Diät nach Mc COLLUM (43) gefüttert.

Diese Diät wurde wie folgt bereitet:

In 12 Liter Wasser werden aufgekocht:

1584 Gramm Maisschrot	720 Gramm Gelatine
1584 Gramm Weizenschrot	144 Gramm Calciumcarbonat
720 Gramm Weizenkleber	48 Gramm Kochsalz

Von dieser Nahrung erhielt jedes Tier pro Tag etwa 40 g und dazu zur Substitution ein Stück Karotte von 5 - 10 g.

Nach dem Absetzen vom Muttertier im Alter von 3 Wochen erhielten alle Tiere diese Rachitis-Diät. Mit dem Futter erhielt die "gesunde" Vergleichsgruppe zur Rachitisprophylaxe täglich peroral 40 I. E. Vitamin D₃ in 0,1 ml Olivenöl gelöst mit Hilfe einer Pipette. Die rachitische Gruppe erhielt dagegen 0,1 ml reines Olivenöl auf die gleiche Weise.

⁺⁾ An dieser Stelle möchte ich dem Forschungs- und Untersuchungs-Institut für Milchvitaminierung in Frankfurt a. M. für die Überlassung der Versuchstiere herzlich danken. Besonders zu Dank verpflichtet bin ich für Durchführung der Röntgenkontrollen.

Um eine objektive Aussage über die Rachitisentstehung bei jedem einzelnen Tier zu haben, wurde vor und nach den Versuchen eine Röntgenkontrolle vorgenommen. Hierfür wurden die hinteren Extremitäten der Tiere geröntgt. Die Weite des Epiphysenspaltes des Femurs am Kniegelenk ist als gestuftes Maß für den Krankheitsgrad eingeführt, wobei die Stufe "0" eine Rachitis höchsten Ausmaßes mit sehr weitem Epiphysenspalt und Stufe "10" einen von Rachitis absolut freien Knochen bedeuten, BEKE-MEIER (7).

Die Tiere wurden auf Torfmull in Einzelgläsern untergebracht. Der Raum, in dem sich die Ratten befanden wurde in einem Temperaturbereich von 24 - 28 ° C gehalten. Gleichzeitig herrschten eine Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % und gedämpftes Tageslicht. Die Tiere wurden täglich nüchtern gewogen. Die für die Untersuchung ausgewählten Tiere beider Gruppen blieben nüchtern. Es wurden täglich 3 Ratten ungefähr gleichen Gewichtes verwendet, wobei abwechselnd ein bzw. zwei Tiere jeder Gruppe ausgesucht wurden. Auf diese Weise entstanden zwei vergleichbare, einander entsprechende Ergebnisreihen.

Methodik der Blutgewinnung und Blutaufarbeitung

Zur Blutgewinnung wurden die Ratten in eine Äthernarkose versetzt. Eine für den Versuch ausreichende Blutmenge kann in der notwendig kurzen Frist nur durch direkte Herzventrikelpunktion gewonnen werden. Die Punktion wird bei eröffnetem Thorax durchgeführt und ergibt mit ziemlicher Sicherheit bei Ratten dieses Alters mit einem durchschnittlichen Gewicht von 60 - 80 Gramm 2 ml Blut.

Für die vorliegenden Versuche war es von entscheidender Wichtigkeit, ungeronnenes Blut zu gewinnen. Um dies zu erreichen, wurden die zur Punktion verwendeten Spritzen vorher mehrfach mit Thrombovetren, einer hochkonzentrierten Heparinlösung (2000 E./ml), durchgezogen.

Das auf diese Weise gewonnene Blut wurde sodann auf zwei, zusätzlich mit einigen Heparinstäubchen präparierte Zentrifugengläschen verteilt:

1. in eine Portion für die Gewinnung der später beschriebenen Blutwerte:
Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Hämatokrit und Serumphosphat
2. in eine weitere Portion für die Hämolysebereitung.

In der Literatur werden verschiedene Hämolyseverfahren beschrieben. So werden bei LÖHR und WALLER (64, 65), E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT (59) und BRUNS (16) Verfahren zur Herstellung einer Hämolyse mit destilliertem Wasser, mit gesättig-Digitoninlösung und durch Einfrieren angegeben.

Alle angegebenen Verfahren wurden in vergleichenden Untersuchungen erprobt. Außerdem wurde die Hämolyse mit gesättigter Saponinlösung bereitet.

Im Gegensatz zu den Angaben von LÖHR und WALLER (64, 65) welche keinen Unterschied in der Aktivitätsausbeute bei den einzelnen Verfahren angeben, wurde gefunden, daß bei einer Kombination von Hämolyse mit destil-

liertem Wasser und Einfrieren der dabei entstehenden Lösung nach dem von BRUNS (16) angegebenen Verfahren bei dem besonders wichtigen Enzym G-6-PDH eine durchschnittlich 15 % höhere Aktivität gegenüber der Digitoninhämolyse erzielt wird. Die vergleichenden Messungen wurden mit dem Blut des gleichen Versuchstieres gleichzeitig ausgeführt.

Das Kombinationsverfahren wurde daher bei allen Untersuchungen angewandt.

Die Blutaufbereitung wurde in folgenden Schritten ausgeführt:

1. die abgeteilte grössere Portion wird bei Zimmertemperatur mit 3000 U/min 15 Minuten zentrifugiert.
2. Vorsichtiges Abhebern des überstehenden Blutplasmas und der schmalen Zone der leichteren weissen Blutzellen.
3. Erste Waschung der so gewonnenen Erythrozyten mit 5 ml eines phosphatfreien Puffers folgender Zusammensetzung:

5	g	NaCl
25	ml	TRIS (1 M, 1 M $\hat{=}$ 125 g/1000 ml)
7	ml	EDTA (0,3 %, 0,3 % $\hat{=}$ 3 g/1000 ml)
0,72	ml	Formalin (35%)
ad	1000,00	ml Wasser

Der p_{H} -Wert liegt dabei um 7,4 .

Der für die Waschungen verwendete Puffer wird auch bei der Erythrozytenzählung mit dem Zählgerät CELLOSCOPE der Fa. A. L. Ljungberg & Co. benützt.

4. Nochmals 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugieren.
5. Abhebern der möglichst farblosen überstehenden Flüssigkeit. Sorgfältiges Absaugen der noch vorhandenen Leukozyten unter Mitnahme einer schmalen Zone von Erythrozyten.
6. Zweite Waschung mit 5 ml des Puffers.

7. Wieder Absaugen des Überstandes unter nochmaliger Mitnahme einer dünnen Schicht Erythrozyten um ganz sicher eine möglichst weitgehende Abtrennung der weissen Zellen zu erreichen.
8. Die so verbliebenen Erythrozyten werden mit 2 ml des genannten Puffers suspendiert.
9. Von dieser Suspension wird ein Teil genommen um vergleichende Blutwerte, welche später beschrieben werden, zu bestimmen.
10. Zur Hämolyse werden nun 1 ml der Suspension und 2 ml destilliertes Wasser (in Quarz zweifach destilliert) zusammengebracht. Sofort tritt Hämolyse ein. Das Hämolysat wird in einer Tiefkühltruhe in einer Kältemischung (NaCl - Lösung) eingefroren.
11. Nach zehn Minuten wird das durchgefrorene Hämolysat unter fließendem kalten Wasser aufgetaut.
12. Abermaliges Einfrieren und nochmals Auftauen des Hämolysates.
13. Anschließend wird 15 Minuten scharf zentrifugiert bei 4 500 U pro min.
14. Der entstandene Überstand, das Hämolysat, wird abpipettiert und für den Test im Verhältnis 1 : 1 mit Wasser verdünnt.

Diese Verdünnung beruht auf der Beobachtung bei Vorversuchen, daß das Hämolysat in der ursprünglichen Konzentration, entsprechend den Vorschriften in der Literatur bereitet, nur sehr kurze Zeit unverändert gehalten werden konnte. Es zeigte sich nämlich, besonders bei Aufbewahrung im Eisbad, daß schon nach einer Stunde feinstverteilte Eiweißkristalle aus der Lösung ausfielen.

Um klare Lösungen für den optischen Test zu erhalten, mußte dann nochmals zentrifugiert werden.

Bei der Auswertung der gemessenen Extinktionen ergab sich daraufhin ein deutlicher Aktivitätsverlust, woraus zu schließen war, daß bei der Auskristallisation Fermenteiweiß verloren geht.

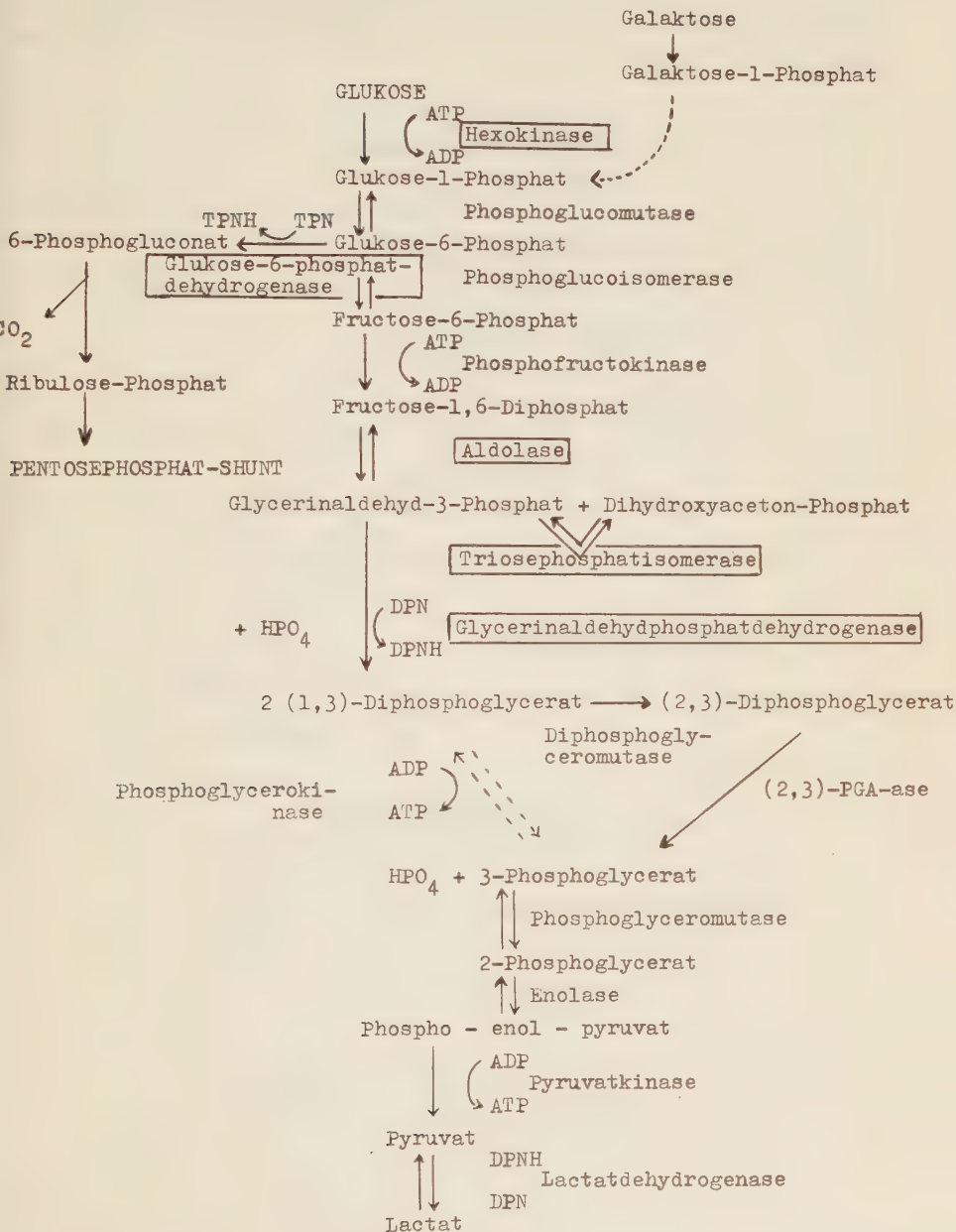
Die Gewinnung und die Aufarbeitung des Blutes dauern nach dem angegebenen Verfahren etwa 3 Stunden.

Stoffwechselschemata mit Einordnung der untersuchten Enzyme

Ausführliche Darstellungen und Literaturhinweise über den Metabolismus der Erythrozyten finden sich bei PRANKERD (48, 49).

Die folgenden zwei Stoffwechselschemata werden aus PRANKERD (48) nach KREBS und KORNBERG übernommen.

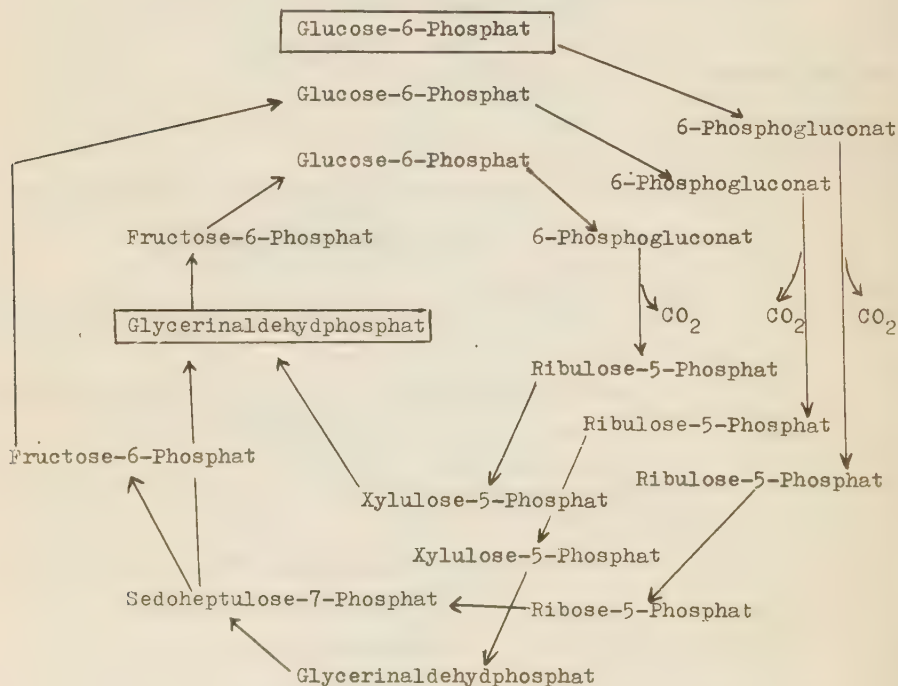
Die Glykolyse im Erythrozyten



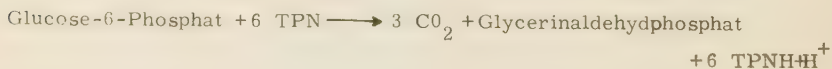
Die eingerahmten Fermente Hexokinase (HK), Glukose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH), Aldolase (ALD), Triosephosphatisomerase (TIM) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) sind die Enzyme, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Schema des Hexose - Monophosphat - Shunt

Hier schleust das Enzym G-6-PDH als Zwischenferment (ZF) das Glukose-6-phosphat (G-6-P) in den Nebenweg ein.



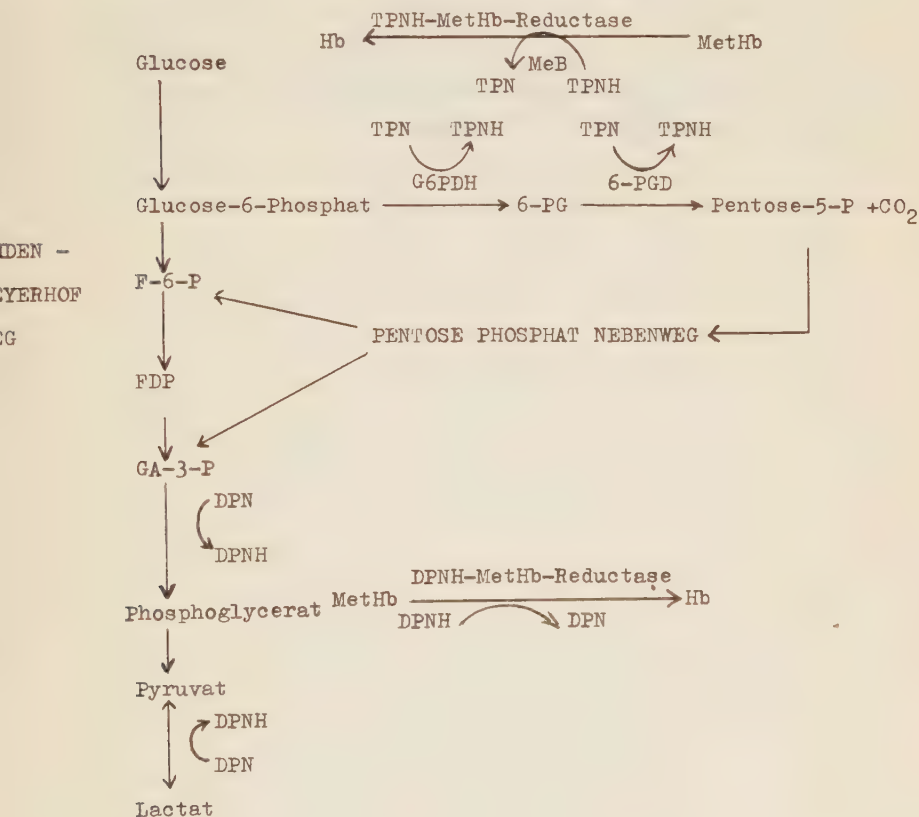
Die Summe der Reaktionsgleichungen des Shunts ergibt:



Die große Bedeutung dieses Reaktionscyclus für den Erythrozyten liegt nach KIESE (33) in der Aufgabe, reduziertes Coenzym TPNH für die Reduktion von Methämoglobin (MetHb) zu Hämoglobin (Hb) bereit zu stellen.

Ein zweiter größerer Teil der Hämoglobinreduktion geschieht über das reduzierte Coenzym DPNH.

Nach BREWER u. a. (13) ergibt sich folgendes Schema:



Aus den angeführten Reaktionsabläufen geht hervor, daß ein Defekt in der Enzymausstattung an zwei Stellen für die MetHb-Reduktion von Bedeutung ist:

- a. dort, wo Glucose-6-Phosphat in den Nebenweg eingebracht wird, d.h. bei dem Ferment G6PDH
- b. dort, wo Glycerinaldehyd-3-Phosphat, d.h. bei dem Ferment GAPDH.

Im Hinblick auf die bisher vorliegenden Ergebnisse von Untersuchungen an Erythrozyten experimentell rachitischer Ratten sind besonders die Enzyme G6PDH und GAPDH von Interesse.

Messungen, Ergebnisse und Tabellen außerhalb der Ferment-
aktivitätsbestimmungen

a) Gewichtstabellen

Während der Versuchsdauer wurde das Gewicht der Tiere täglich kontrolliert. Die Tabellen 1 und 2 geben die Gewichtsentwicklung der beiden Tiergruppen wieder. Der 1. und der 2. Tag wurden als Liefertag und Gewöhnungstag nicht berücksichtigt.

Zeichenerklärung:

+ = gestorben

o = Reservetier unter gleichen Bedingungen gehalten

/ = Versuchstag mit letzter Wägung

Tabelle 1

Gewichtsentwicklung der experimentell rachitischen
Ratten in Gramm

Nr.	G	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	Mittlere Ge- wichtszunahme pro Tag
1	♀	60,8	61,5	61,8/										0,33
2	♂	60,0	60,9	61,7/										0,57
3	♀	60,9	64,3	64,9	67,0	71,9/								2,20
4	♀	59,8	64,1	64,6	65,9	71,6/								2,36
5	♂	69,8	69,6	74,6	73,2	77,4	79,6	83,0	84,8	91,5	90,0	91,3	95,7/	2,16
6	♀	58,8	58,0	59,9	64,2	67,5	66,7/							1,32
7	♂	49,3	48,0	53,9	51,4	55,7	53,3	55,4	56,3	59,7	+			1,15
8	♀	56,0	58,0	59,4	63,0/									1,75
9	♂	46,8	48,0	49,9	47,8	52,0	54,2	58,0	59,9	64,6	65,7/			1,89
10	♂	60,7	60,2	65,4	68,5	69,5	74,8/							2,01
11	♂	65,2	67,6	71,1	69,9	74,6	70,6	74,2/						1,29
12	♀	55,2	60,4	60,6	61,2	65,7	66,6	69,2	70,7	74,6	75,2	74,8	76,4	1,78
13	♂	-	0											-
14	♀	-	0						61,5	64,7	62,6	65,4/		0,98
15	♂	-	0	+										-

Mittlere Gewichtszunahme pro Tag

$$\bar{x} = 1,52$$

Standardabweichung

$$s = 0,417$$

Beim Vergleich der Tabellen 1 und 2 fällt auf, daß die experimentell rachitischen Ratten bei Gabe der gleichen Nahrungsmenge eine höhere mittlere Gewichtszunahme pro Tag aufweisen als die mit täglich 40 I. E. Vitamin D₃ geschützten Vergleichsratten.

b) Blutwerte:

In den Tabellen 3 und 4 werden die Erythrozytenzahlen, Leukozytenzahlen, Hämatokritwerte, mittleren Erythrozytenvolumen und Serumphosphatwerte der Versuchstiere zusammengestellt. +)

Die Erythrozytenzahlen wurden mit dem Zählgerät CELLOSCOPE der Firma A. L. Ljungberg & Co. jeweils doppelt bestimmt, wobei der Mittelwert der Bestimmungen genommen wurde. Die Zahl der Erythrozyten wurde im ursprünglichen Blut und in der Erythrozytensuspension bestimmt.

Die Leukozyten wurden mit Hilfe einer BÜRKER - Kammer gezählt.

Die Hämatokritwerte der ursprünglichen Blutproben wurden als Mittelwert von je drei Bestimmungen gewonnen, wobei 30 Minuten bei etwa 4000 U/min zentrifugiert wurde.

Die Hämatokritwerte der Suspensionen wurden rechnerisch aus den Erythrozytenzahlen und den Hämatokritwerten des ursprünglichen Blutes nach dem "Dreisatz" ermittelt.

Das jeweilige mittlere Erythrozytenvolumen wurde aus der Zahl der Zellen der Suspension und dem Hämatokrit der Suspension nach der Formel

$$\frac{\text{Hämatokrit} \cdot 10}{\text{Zellzahl} \cdot 10^6} \quad [\mu^3]$$

errechnet.

+) An dieser Stelle möchte ich Frl. R. Passon von der Univ. Kinderklinik herzlich für die zuverlässige und freundliche Hilfe bei der Bestimmung dieser Werte danken.

Die Serumphosphatwerte wurden mit einer Mikromodifikation der Methode von FISKE - SUBBAROW (23) mit einem BECKMANN - Photometer gemessen.

Tabelle 3

Blutwerte der experimentell rachitischen

Ratten. Tierzahl $n_2 = 12$.

Abkürzungen: EZ = Erythrozytenzahl in 10^6 pro mm^3

LZ = Leukozytenzahl pro mm^3 , HK = Hämatokrit

SP = Serumphosphat in mg%, N = ursprüngliches Blut,

S = Erythrozytensuspension, $\bar{V}$ = mittleres Erythrozytenvolumen in μ^3

Nr.	EZ _N	HK _N	EZ _S	HK _S	$\bar{V}$	LZ _N	SP
1	6,15	37,00	1,67	10,02	60,15	5.700	4,43
2	6,09	41,17	2,22	15,01	67,61	5.000	2,16
3	6,37	39,17	2,54	15,62	61,50	7.300	2,04
4	6,58	40,33	2,12	12,99	61,27	6.200	4,81
5	6,34	43,00	2,17	14,72	67,83	6.800	2,90
6	5,44	35,50	2,32	15,14	65,26	7.400	8,60
8	6,48	41,17	2,48	15,76	63,58	6.500	2,99
9	6,30	38,17	1,98	12,00	60,61	7.900	2,64
10	5,71	37,00	1,99	12,89	64,48	9.700	1,84
11	6,09	38,33	1,95	12,27	62,92	7.000	1,67
12	6,40	38,00	1,72	10,21	59,36	5.200	2,10
14	7,16	43,17	2,06	12,42	60,29	5.300	2,16

Mittelwert $\bar{x} = 6,26$ 39,33 62,90

Standard-

abweichung $s = 0,43$ 2,443 2,904

c) Ergebnisse der Röntgenkontrolle nach dem Versuch

In Tabelle 5 wird eine vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse der Röntgenkontrolle und der Bestimmung der Serumphosphatwerte gegeben.

Tabelle 5

exp.rach. Ratten			geschützte Ratten		
$n_2 = 12$			$n_1 = 12$		
Nr.	Röntgen-Grad	SP (mg%)	Nr.	Röntgen-Grad	SP (mg%)
1	1	4,43	22	8	5,53
2	2	2,16	23	9	5,60
3	0	2,04	24	8,5	7,07
4	1	4,81	25	8	10,42
5	0,5	2,90	26	9	14,14
6	0	8,60	27	8,5	7,93
8	0	2,99	28	8	7,56
9	0,5	2,64	29	8,5	13,86
10	0	1,84	30	8	5,71
11	0	1,67	31	9,5	5,80
12	0	2,10	34	7,5	5,24
14	2	2,16	35	8	6,34

Rechnerische Hilfsgrößen zur Berechnung der Enzymaktivitäten

Im Abschnitt II₄ wurde mitgeteilt, daß die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen auf die Bezugsgrößen

- a) Aktivität pro 10¹¹ Erythrozyten
- b) Aktivität pro Milliliter Erythrozytenvolumen

berechnet wurden.

Hierzu sind folgende Hilfsgrößen erforderlich, welche sich aus den Werten der bisher wiedergegebenen Tabellen herleiten lassen:

1. Faktor 1 zur Umrechnung abgelesener Extinktionsänderungen

ΔE /min in Millieinheiten pro Milliliter des eingesetzten Hämolyrates.

nach S. 12 gilt:
$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \quad [\mu \text{Mol}]$$

$$\frac{E}{t} \cdot \frac{1}{d} = \frac{c}{t} \quad \left[\frac{\mu \text{Mol}}{\text{min}} \right]$$

Für ein bestimmtes Küvettenvolumen $V_{\text{Küv}}$ und ein bestimmtes einpipettiertes Hämolyratvolumen V_{Pip} gilt bei

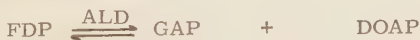
= 366 m und einer Schichtdicke $d = 1$:

$$\frac{\Delta E}{t} \cdot \frac{1 \cdot V_{\text{Küv}}}{3,3 \cdot 1 \cdot V_{\text{Pip}}} = \frac{c}{t} \quad \left[\frac{\mu \text{Mol}}{\text{min}} \right]$$

$$\frac{\Delta E}{t} \cdot \text{Faktor 1} = \frac{c}{t} \quad \left[\frac{\mu \text{Mol}}{\text{min}} \right]$$

$$\text{Faktor 1} = F 1 = \frac{V_{\text{Küv}}}{V_{\text{Pip}} \cdot 3,3} \quad \left[\frac{\mu \text{Mol}}{\text{ml}} \right]$$

Variable für den jeden bestimmten Enzymtest konstanten Faktor F 1 sind also das Küvettenvolumen und das zugesetzte Hämolyratvolumen. Der Faktor F1 ist zu halbieren, wenn wie bei der Aldolase - Reaktion zwei Produkte entstehen:



2. Mit dem Faktor F 2 ist die Berechnung der Aktivität eines Enzymes, das aus 10^{11} Erythrozyten gewonnen wurde, in Millieinheiten möglich.

Der Faktor F 2 ergibt sich aus den bei der Herstellung des Hämoly-sates gebrauchten Verdünnungen und der Erythrozytenzahl der zur Hämolyse verwendeten Suspension.

Bei der Hämolyse wird die Aufschwemmung im Verhältnis 1:3 verdünnt.

Zum Test wird das Hämolysat nochmals im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Enthält 1 mm³ Suspension x · 10⁶ Erythrozyten, so enthalten 10² · cm³ Suspension entsprechend x · 10¹¹ Erythrozyten.

Dann ergibt sich der Faktor F 2 als

$$F\ 2 = \frac{3 \cdot 2 \cdot 10^2}{x} \left[\frac{\text{cm}^3 \text{ Hämolysat}}{10^{11} \text{ Erythrozyten}} \right]$$

Durch Multiplikation der Faktoren F 1 und F 2 ergeben sich die Millieinheiten pro 10¹¹ Erythrozyten.

$$F\ 1 \cdot F\ 2 = \left[\frac{\text{Milli E}}{\text{ml Hämolysat}} \right] \cdot \left[\frac{\text{ml Hämolysat}}{10^{11} \text{ Erythroz.}} \right] = \frac{\text{Milli E}}{10^{11} \text{ Erythroz.}}$$

Der Faktor F 2 hat als Variable die Erythrozytenzahl der Suspension eines jeden einzelnen Versuchstieres und muß daher für jedes Tier einzeln berechnet werden.

3. Ein Faktor F 3, der als Veränderliche die Erythrozytenzahl und den Hämatokrit der Suspension enthält, erlaubt die Berechnung von Millieinheiten Enzymaktivitäten pro Milliliter Erythrozytenvolumen.

$$F\ 3 = \frac{\text{Erythro. Zahl der Susp. in } 10^6}{\text{errechneter Hämatokrit der Susp.}} = \frac{1 \cdot [10^{11} \text{ Ery.}]}{\text{ml Ery. Vol.}}$$

F 3 wird in dieser Berechnung vom mittleren Erythrozytenvolumen abgeleitet:

$$(1) \quad \frac{\text{Hämatokrit} \cdot 10}{\text{Ery. Zahl in } 10^6} = \text{mittleres Volumen 1 Erythrozyten in } \mu^3$$

$$(2) \quad \frac{\text{Ery. Zahl in } 10^6}{\text{Hämatokrit} \cdot 10} = \frac{1 \cdot [1 \text{ Erythro.}]}{\mu^3}$$

$$(3) \quad \frac{\text{Hämatokrit} \cdot 10 \cdot 10^{11}}{\text{Ery. Zahl in } 10^6} = \text{mittleres Volumen } 10^{11} \text{ Erythrozyten in } \mu^3$$

$$(4) \quad 1 \text{ Milliliter enthält } 10^{12} \mu^3$$

Bildet man von (3) analog (2) den Kehrwert und setzt (4) ein, so ergibt sich der obige Faktor F 3.

Durch Multiplikation von F 3 mit dem Produkt F 1 · F 2 erhält man:

$$F\ 1 \cdot F\ 2 \cdot F\ 3 = \frac{\text{Milli E.}}{10^{11} \text{ Ery.}} = \frac{1 \cdot 10^{11} \text{ Erythro.}}{\text{Milliliter EryVol}} = \frac{\text{Milli E.}}{\text{ml Ery. Vol.}}$$

Faktor 3 hängt wie Faktor 2 von den jeweiligen Blutwerten der Versuchstiere ab, und muß daher für jedes Tier einzeln berechnet werden.

In der nachfolgenden Tabelle 6 werden die Faktoren F 2 und F 3 der experimentell rachitischen sowie der mit Vitamin D₃ behandelten Ratten zusammengestellt.

Tabelle 6

exp. rach. Ratten			Vit. D ₃ Ratten		
n ₂ = 12			n ₁ = 12		
Nr.	F 2	F 3	Nr.	F 2	F 3
1	359, 28	0, 1666	22	284, 36	0, 1548
2	270, 27	0, 1479	23	280, 37	0, 1674
3	236, 22	0, 1626	24	451, 13	0, 1591
4	283, 02	0, 1632	25	208, 33	0, 1634
5	276, 50	0, 1474	26	320, 86	0, 1554
6	258, 62	0, 1532	27	320, 86	0, 1636
8	241, 94	0, 1573	28	298, 51	0, 1770
9	303, 03	0, 1650	29	340, 91	0, 1554
10	301, 51	0, 1543	30	387, 09	0, 1504
11	307, 69	0, 1512	31	306, 12	0, 1576
12	348, 84	0, 1684	34	294, 12	0, 2090
14	291, 26	0, 1658	35	320, 86	0, 1626

Die Berechnung der Enzymaktivität bei den gewählten Bezugsgrößen geht nun folgenden Weg:

- a) Aktivität pro Milliliter Hämolsat

$$\text{Aktivität/ml Hämolsat} = \text{abgelesene } \Delta E/\text{min} \cdot F 1$$

- b) Aktivität pro 10¹¹ Erythrozyten

$$\text{Aktivität}/10^{11} \text{ Erythrozyten} = \text{Aktivität/ml Hämolsat} \cdot F 2$$

- c) Aktivität pro ml Erythrozytenvolumen

$$\text{Aktivität/ml Erythrozytenvol.} = \text{Aktivität}/10^{11} \text{ Erythrozyten} \cdot F 3$$

Statistische Auswertung

Die errechneten Aktivitätswerte wurden statistisch ausgewertet. Es wurden bestimmt:

1. Der Mittelwert $\bar{x}$ der einzelnen Messungen,
2. die Standardabweichung s des Einzelwertes vom Mittelwert nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3. die Standardabweichung $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes nach der Formel

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Hierbei sind:

n = Zahl der Einzelwerte

x_i = Einzelwert

$\bar{x}$ = Arithmetisches Mittel der Einzelwerte

Zur Signifikanzprüfung eines Unterschiedes der Mittelwerte der Gruppen "experimentell rachitische" Ratten und "geschützte" Ratten wurden der sogenannte "t - Test" und für "t" die Signifikanzschranken der STUDENT - Verteilung für das einfache Integral "p" verwendet, weil die Versuche unter der Erwartung einer verminderten Aktivität begonnen wurden (21).

Die Formel für den "t - Test" lautet:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_{x_1} + S_{x_2}}{n_1 + n_2 - 2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

wobei sich der Index "1" auf die geschützte Serie, der Index "2" auf die Serie der experimentell rachitischen Tiere beziehen.

Ein signifikanter Unterschied wird in der vorliegenden Arbeit für $p = 0,05$ als erwiesen angenommen.

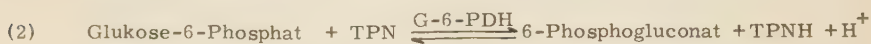
Der HEXOKINASE - Test

Mit der von dem Enzym Hexokinase gesteuerten Reaktion gelangt das Kohlehydrat Glukose in den energieliefernden Stoffwechsel.

Es ergibt sich die Reaktionsgleichung:



Diese Reaktion lässt sich aber nicht direkt im Photometer verfolgen. Daher benützt man den gekoppelten optischen Test, indem die folgende TPN-abhängige Hilfsreaktion angeschlossen wird:



Man benützt also die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase als Indikatorenzym. Nach dem bei der Messtechnik beschriebenen Prinzip ist der Umsatz von $\text{TPNH} + \text{H}^+$ die Messgrösse.

Eine ausführliche Literaturübersicht findet sich in den "Biochemica Informationen" von C. F. Eoehringer.

Bestimmungsmethoden werden u. a. von RACKER (51), RACKER et al. (20) und in Zusammenstellung von TRAUTSCHOLD (63) angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Testansatz benützt, der nach dem in den Boehringer Testvorschriften von 1961 angegebenen Hexokinasetest modifiziert wurde.

Testansatz: Küvettenvolumen: 3 ml

Reihenfolge	Konzentration der Lösungen	Molarität der Lösungen	Menge der Substanz im Testvolumen
1,05 ml TRAP	0,93 g/100ml $p_H = 7,6$	$5 \cdot 10^{-2}$ M TRA	--
0,20 ml TPN	10 mg/ml	$1,34 \cdot 10^{-2}$ M	$2,8 \cdot 10^{-6}$ Mol
0,01 ml G6PDH	0,2 mg/ml	--	$2,0 \cdot 10^{-3}$ mg $\triangleq$ 3 mE
0,20 ml $MgCl_2$	9,53 g/100ml	$1,0 \cdot 10^{-1}$ M	$2,0 \cdot 10^{-3}$ Mol
1,20 ml Glukose in TRAP	100 mg/ml	--	$6,6 \cdot 10^{-4}$ Mol
0,24 ml Hämolytats	--	--	--
Start			
0,10 ml ATP	10 mg/ml	$2,0 \cdot 10^{-2}$ M	$1,98 \cdot 10^{-6}$ Mol
3,00 ml			

TRAUTSCHOLD (63), der mit Leberhomogenaten arbeitete, gibt einen Testansatz an, der das in der Leber und einigen anderen Organen vorkommende spezifische Ferment Glukose-6-Phosphatase berücksichtigt. Dieses Enzym, das strukturgebunden ist, konkurriert mit der G-6-PDH um das gemeinsame Substrat G-6-P. Wird diese Phosphatase beim Leberenzymtest nicht berücksichtigt, so wird der Hexokinasewert immer zu niedrig gemessen.

Im Muskel, in dem die Glucose wie im Erythrozyten anaerob bis zum Lactat abgebaut wird, ist nach LEUTHARDT (40) die Glukose-6-Phosphatase nicht vorhanden. Es wurde deshalb, da keine gegenteilige Literatur bekannt ist, analog angenommen, daß auch im Erythrozyten, wie nach der Funktion der roten Zelle zu erwarten, die Glukose-6-Phosphatase nicht vorhanden ist. Damit erscheint die benützte Testzusammensetzung erlaubt. Bestätigt wird diese Annahme schließlich durch die Ergebnisse des G-6-PDH-Testes.

Bei der Aufbereitung des Blutes wird ein Puffer verwendet, der EDTA enthält. EDTA ist als Komplexbildner für Schwermetallionen notwendig, da diese manche Enzyme z. B. die GAPDH hemmen.

Nach E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT (59) kann EDTA die Hexokinase in gewissem, nicht sehr hohem, Maße hemmen. Da EDTA andererseits als Protektor benötigt wird, muß dieser Mangel in Kauf genommen werden.

Der angewandte Testansatz erwies sich innerhalb der biologischen Streubreite in den Vorversuchen als reproduzierbar und erbrachte auch bei Kontrollen mit einfacher und doppelter Hämolysatmenge einfache bzw. doppelte Extinktionsänderungen.

Ergebnisse der Aktivitätsmessung des Enzym Hexokinase

Tabelle 7

Experimentell rachitische Tiere

Tierzahl $n_2 = 12$, Faktor $F_1 = 3,78$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	Milli E/ml Hämoly- syt	Milli E/ 10^{11} Erythrocyt.	Milli E/ml Ery- throcyt. Vol.
1	1,000	3,78	1.358	226
2	1,428	5,40	1.459	216
3	1,000	3,78	893	145
4	1,111	4,20	1.187	194
5	1,250	4,73	1.308	193
6	1,667	6,30	1.629	250
8	1,250	4,73	1.144	180
9	1,428	5,40	1.636	270
10	1,667	6,30	1.899	293
11	1,810	6,84	2.105	318
12	1,538	5,81	2.087	341
14	1,600	6,05	1.762	292
Mittelwert $\bar{x}$			1.534	243
Standardabweichung s			$375 \hat{=} 24,5\%$	$60,61 \hat{=} 24,9\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			108,38	17,5

Tabelle 8

Mit Vitamin D₃ geschützte Ratten

Tierzahl n₁ = 12, Faktor F 1 = 3,78

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	Milli E/ml Hämoly- sat	Milli E/10 ¹¹ Erythro.	Milli E/ml Ery- thro. Vol.
22	1,330	5,03	1.430	221
23	1,379	5,24	1.461	245
24	1,250	4,73	2.134	340
25	0,952	3,60	750	123
26	0,769	2,91	934	145
27	1,538	5,81	1.864	305
28	1,538	5,81	1.734	307
29	1,250	4,73	1.613	251
30	1,111	4,20	1.626	245
31	1,250	4,73	1.448	228
34	1,538	5,81	1.709	357
35	1,818	6,87	2.204	358
Mittelwert $\bar{x}$			1.576	260
Standardabweichung s			421 $\hat{=}$ 26,9%	76,7 $\hat{=}$ 29,5%
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			122,5	22,17

Im Signifikanztest nach STUDENT ergibt sich für $n_1 + n_2 - 2 = 22$

a) bei Berechnung auf Aktivität pro 10^{11} Erythrozyten:

$t = 0,2570$ und p damit zwischen $0,40 - 0,35$

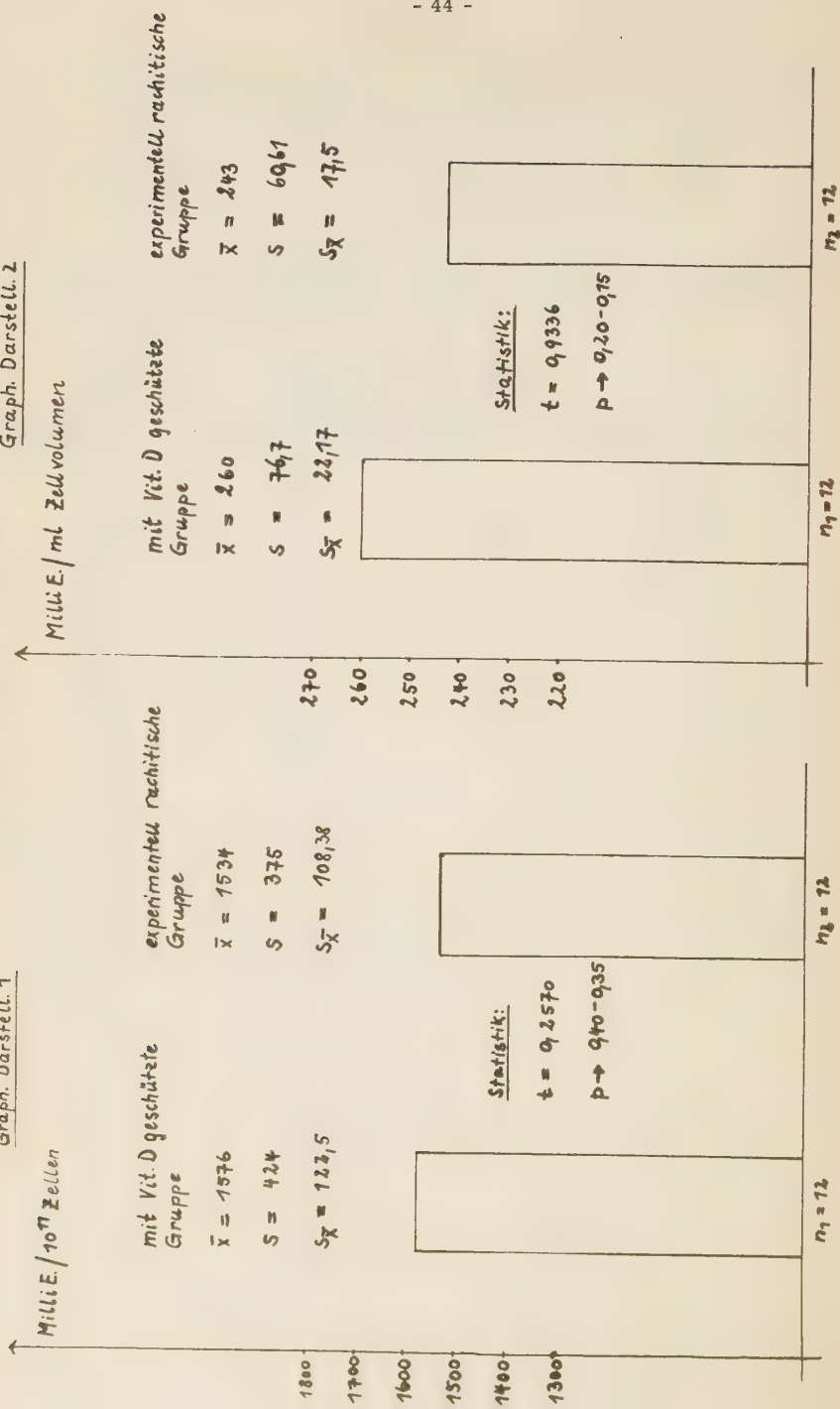
b) bei Berechnung auf Aktivität pro ml Erythrozytenvolumen:

$t = 0,9336$ und p damit zwischen $0,20 - 0,15$

Die Ergebnisse werden in den graphischen Darstellungen 1 und 2 veranschaulicht.

Graph. Darstell. 1

Graph. Darstell. 2



Der GLUKOSE-6-PHOSPHAT - DEHYDROGENASE-Test

Mit der von dem Enzym Glukose-6-Phosphatdehydrogenase gesteuerten Reaktion gelangt die phosphorilierte Hexose G-6-P in den HEXOSE - MONOPHOSPHAT - SHUNT. Es ist dies die gleiche Reaktion, die beim Hexokinase - Test als Indikatorreaktion benützt wird.

Es ergibt sich die Reaktionsgleichung (69):



Der Umsatz läßt sich direkt im Photometer verfolgen, sodaß Fehlerquellen durch komplizierte Testzusammensetzungen ausgeschlossen werden können.

Das Enzym G-6-PDH ist wegen seiner zentralen Stellung als Zwischenferment Gegenstand vieler Untersuchungen auf die später eingegangen wird. Eine ausführliche Literaturübersicht findet sich wieder in den Biochemica Informationen von C. F. Boehringer.

Die Bestimmungsmethode, an die sich alle Untersucher anlehnen, wurde von KORNBERG und HORECKER (36) angegeben. In dieser Arbeit wurde ein Testansatz benützt, wie er in den Boehringer Testvorschriften von 1963 angegeben wird. Lediglich die TPN-Konzentration wurde etwas erhöht, da die Vorversuche bei vergleichenden Messungen für die schließlich gewählte TPN-Konzentration die höchste Aktivität ergaben.

Testansatz:

Küvettenvolumen: 3ml

Reihenfolge	Konzentration der Lösungen	Molarität der Lösungen	Menge der Substanz im Testvolumen
2,70 ml TRAP	0,93 g/100 ml $p_H = 7,6$	$5,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	---
0,15 ml TPN	10 mg/ml	$1,34 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$2,1 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,10 ml Hämoly- satsat	---	---	---
Start			
0,05 ml G-6-P	107 mg/ml	$4,1 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$2,05 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
3,00 ml			

Ergebnisse der optischen Aktivitätsmessung des Enzyms G-6-PDH

Tabelle 9

Rachitische Tiere

Tierzahl $n_2 = 12$, Faktor $F_1 = 9,09$

Nr.	Δ E/min	Milli E/ml Häm.	Milli E/ 10^{11} Ery.	Milli E/ml Ery. Vol.
1	8,000	72,72	26.127	4.353
2	6,667	60,60	16.378	2.422
3	7,500	68,18	16.105	2.619
4	8,000	72,72	20.581	3.359
5	8,888	80,79	22.338	3.293
6	10,000	90,90	23.509	3.602
8	10,833	107,56	26.023	4.093
9	7,142	64,92	19.673	3.246
10	7,778	70,70	21.316	3.289
11	8,571	77,91	23.972	3.625
12	5,714	51,94	18.119	3.051
14	8,333	75,75	22.108	3.666
Mittelwert $\bar{x}$			21.354	3.385
Standardabweichung s			$3.355 \hat{=} 15,7\%$	$547 \hat{=} 16,2\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			970	158

Tabelle 10

Geschützte Tiere

Tierzahl $n_1 = 12$, Faktor $F_1 = 9,09$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	Milli E/ml Häm.	Milli E/ 10^{11} Ery.	Milli E/ml Ery. Vol.
22	10,588	96,24	27.366	4.236
23	8,000	72,72	20.389	3.413
24	8,000	72,72	32.806	5.219
25	14,444	131,30	27.354	4.470
26	7,500	68,18	21.876	3.400
27	9,000	81,81	26.249	4.294
28	9,000	81,81	24.421	4.323
29	8,333	75,75	25.824	4.013
30	6,250	56,81	21.991	3.307
31	9,000	81,81	25.044	3.947
34	8,750	79,54	23.394	4.889
35	8,750	79,54	25.521	4.150
Mittelwert $\bar{x}$			25.186	4.138
Standardabweichung s			3.264 $\hat{=} 13 \%$	582 $\hat{=} 14 \%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			943	168

Im Signifikanztest der Ergebnisse beider Kollektive ergeben sich:

a) für die Berechnung der Enzymaktivität pro 10^{11} Zellen:

$t = 2,8364$ und damit p zwischen $0,005 - 0,0025$

b) für die Berechnung der Enzymaktivität pro Milliliter Erythrozytenvolumen:

$t = 3,2677$ und damit p zwischen $0,0025 - 0,005$

Die Ergebnisse werden in den graphischen Darstellungen 3 und 4 veranschaulicht.

G-6-PDH - TEST

Graph. Darstell. 3

Graph. Darstell. 4

Milli E./10¹¹ Zellen

Milli E./ml Zellvolumen

mit Vit. D geschützte Gruppe

experimentell rachitische Gruppe

experimentell rachitische Gruppe

$$\bar{x} = 25.186$$

$$s = 3.264$$

$$s_{\bar{x}} = 943$$

$$\bar{x} = 27.354$$

$$s = 3.355$$

$$s_{\bar{x}} = 970$$

$$\bar{x} = 4.138$$

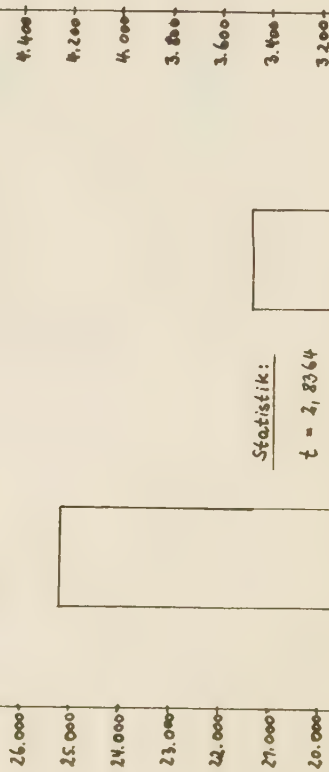
$$s = 582$$

$$s_{\bar{x}} = 168$$

$$\bar{x} = 3.385$$

$$s = 547$$

$$s_{\bar{x}} = 158$$



Statistik:

$$t = 2,8364$$

$$p \rightarrow 0,005 - 0,0025$$



Statistik:

$$t = 3,2677$$

$$p \rightarrow 0,0025 - 0,0005$$

Der ALDOLASE - TEST

Mit der von dem Enzym Aldolase gesteuerten Reaktion wird das zweifach phosphorylierte Hexosemolekül Fructose-1, 6-diphosphat in zwei Bruchstücke, das Dihydroxyacetonphosphat und den Phosphoglycerinaldehyd zerlegt. Die beiden entstehenden Triosephosphate stehen im enzymatischen Gleichgewicht.



Bei Triosephosphat-Isomerase (TIM) Überschuß liegt das Gleichgewicht stark auf der Seite von DAP.

Die ALD - Aktivität wird mit einem zusammengesetzten optischen Test, wie er im Prinzip von RACKER (52) angegeben wurde, bestimmt. Dabei ist TIM das Hilfsenzym, während Glycerophosphatdehydrogenase (GDH) als Indikatorenzym dient. Gemessen wird die Extinktionsänderung des Coenzym DPNH.



Wie im Abschnitt IV₁ erklärt wurde, wird zur Berechnung der ALD - Aktivität nur der halbe Betrag der Extinktionsänderung benützt, da die Indikatorreaktion zwei Mol DAP pro Mol FDP umsetzt.

Weitere Testangaben finden sich bei BRUNS (16) und bei BEISENHERZ, BOLTZE, BÜCHER et al. (5).

Ausführliche Literaturangaben finden sich ebenfalls bei den Testinformationen der Fa. C. F. Boehringer.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Bestimmungsansatz benützt, wie er in der Testvorschrift für ALD von Boehringer angegeben wird.

Testansatz:

Küvettenvolumen: 3 ml

Reihenfolge	Konzentration der Lösungen	Molarität der Lösungen	Menge der Substanz im Testvolumen
2,74 ml Puffer $p_H = 7,4$	---	$5,6 \cdot 10^{-2}$ M	---
0,05 ml DPNH	10 mg/ml	$1,5 \cdot 10^{-2}$ M	$0,75 \cdot 10^{-6}$ Mol
0,01 ml GDH/TIM	2 mg/ml	---	$2,00 \cdot 10^{-2}$ mg
Start			
0,20 ml HämolySAT	---	---	($\hat{=}$ 10 mE GDH und 45 mE TIM)
3,00 ml			

Als Puffer wurde eine Collidin - Mono - jodacetat - Fructose -1,6-diphosphat Mischung nach Angaben von BERGMEYER (9) in der Zusammensetzung:

$5,6 \cdot 10^{-2}$ M Collidinpuffer $p_H 7,4$;
 $3 \cdot 10^{-4}$ M Monojodacetat
 $2 \cdot 10^{-3}$ M FDP;

angewendet.

Ergebnisse der optischen Aktivitätsmessung des Enzyms Aldolase

Tabelle 11

experimentell rachitische Tiere

Tierzahl $n_2 = 12$, Faktor $F_1 = 2,27$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M E. / 10^{11} Erythr.	M. E. /ml Ery. Vol.
1	4,000	9,08	3.262	543
2	4,375	9,93	2.684	397
3	7,500	17,03	4,023	654
4	7,142	16,21	4.588	749
5	4,666	10,59	2.928	432
6	5,385	12,22	3.160	484
8	6,667	15,13	3.660	576
9	4,545	10,32	3.127	516
10	6,250	14,19	4.278	660
11	6,667	15,13	4.655	704
12	3,571	8,11	2.829	476
14	4,545	10,32	3.006	498
Mittelwert $\bar{x}$			3.517	557
Standardabweichung s			$702 \hat{=} 20,0\%$	$112 \hat{=} 20,1\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			203	32,37

/

Tabelle 12

geschützte Tiere

Tierzahl $n_1 = 12$; Faktor $F_1 = 2,27$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythro.	M. E. /ml Ery. Vol.
22	8,750	19,86	5.647	874
23	5,555	12,61	3.535	592
24	3,000	6,81	3.072	489
25	9,677	21,96	4.575	748
26	5,714	12,97	4.162	647
27	6,667	15,13	4.855	794
28	4,807	10,91	3.257	576
29	5,217	11,84	4.036	627
30	5,714	12,97	5.021	755
31	7,500	17,03	5.213	822
34	4,000	9,08	2.671	558
35	5,555	12,61	4.046	658
Mittelwert $\bar{x}$			4.174	678
Standardabweichung s			$922 \hat{=} 22,1\%$	$119 \hat{=} 17,6\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			266	34,4

Im Signifikanztest nach STUDENT ergeben sich:

a) für die Berechnung pro 10^{11} Erythrozyten:

$$t = 1,9643 ; \quad p \text{ zwischen } 0,05 - 0,025$$

b) für die Berechnung pro ml Erythrozytenvolumen:

$$t = 2,5695 ; \quad p \text{ zwischen } 0,01 - 0,005$$

Diese Ergebnisse werden in den graphischen Darstellungen 5 und 6 veranschaulicht.

ALDOLASE-TEST

Graph. Darstell. 5

▲ Milli E./ 10^3 Zellen

mit Vit. D geschütete
Gruppe

$\bar{x} = 4.174$
 $s = 922$
 $s\bar{x} = 266$

experimentell nachrichtliche
Gruppe

$\bar{x} = 3.517$
 $s = 702$
 $s\bar{x} = 203$

Statistik:

$t = 1,9643$

$p \rightarrow 0,05 -$
 $0,025$

$n_1 = 12$

$n_2 = 12$

Graph. Darstell. 6

Milli E./ml Zellvolumen

mit Vit. D geschütete
Gruppe

$\bar{x} = 678$
 $s = 119$
 $s\bar{x} = 344$

experimentell nachrichtliche
Gruppe

$\bar{x} = 557$
 $s = 112$
 $s\bar{x} = 32,37$

Statistik:

$t = 2,5695$

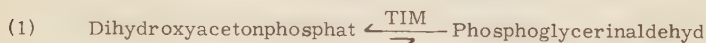
$p \rightarrow 0,01 -$
 $0,005$

$n_1 = 12$

$n_2 = 12$

Der TRIOSEPHOSPHAT-ISOMERASE - Test

Mit der von dem Enzym Triosephosphatisomerase gesteuerten Reaktion wird das chemische Gleichgewicht zwischen den durch die Aldolase-Reaktion entstehenden Triosephosphaten Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehydphosphat eingestellt.



Es gelingt die Aktivität des Enzyms TIM im zusammengesetzten optischen Test zu messen, BEISENHERZ (60). Dabei ist die Reaktion



Indikatorreaktion.

Wie im Abschnitt V₃ erwähnt wurde, liegt das Gleichgewicht der Reaktion



stark auf Seiten der Bildung von Dihydroxyacetonphosphat.

In den Literaturangaben bei BEISENHERZ (6), RACKER (52) sowie in den Testvorschriften der Fa. C. F. Boehringer wird im Testansatz das Triosephosphatester (TPE) - Gemisch von DAP und GAP verwendet. Bei diesem Testansatz muß die Reaktion des eingesetzten DAP abgewartet werden. In den Vorversuchen dieser Arbeit wurden die Aktivitätsbestimmungen von TIM ebenfalls mit TPE ausgeführt. Der Test mit reinem GAP vermeidet diese Unsicherheit.

Das GAP wurde nach einer Mitteilung von MICHAL (21) aus dem Bariumsalz des Di-acetals des GAP (GAP - DA - BA) gewonnen. Dabei wurden über einen DOWEX - Ionenaustauscher die Bariumionen gegen Wasserstoffionen ausgetauscht und anschließend wurde die Lösung 48 Stunden bei 40°C zur Hydrolyse des Acetals aufbewahrt.

Anschließend wird die GAP - Lösung eingefroren. Da die GAP - Lösung selbst in eingefrorenem Zustand äusserst instabil ist, wurde die Lösung jede Woche frisch angesetzt.

Die Messungen der vorliegenden Arbeit wurden mit einem Testansatz durchgeführt, der nach den Angaben in der entsprechenden Biochemica Information von Boehringer modifiziert wurde.

Testansatz

Küvettenvolumen: 3 ml

Reihenfolge	Konzentration der Lösungen	Molarität der Lösungen	Menge der Substanz im Testvolumen
2,28 ml TRAP $p_H=7,6$	---	$5,0 \cdot 10^{-2}$ M	---
0,01 ml GDH	1 mg/ml	---	0,01 mg $\hat{=}$ 7,5 mE
0,10 ml DPNH	10 mg/ml	$1,5 \cdot 10^{-2}$ M	$1,5 \cdot 10^{-6}$ Mol
0,01 ml Hämolytat	---	---	---
Start			
0,60 ml GAP	3 mg/ml	$1,76 \cdot 10^{-2}$ M	$1,06 \cdot 10^{-5}$ Mol
3,00 ml			

Ergebnisse der optischen Aktivitätsmessung des Enzyms Triosephosphat-
isomerase

Tabelle 13

experimentell rachitische Tiere

Tierzahl $n_2 = 11$; Faktor F 1 = 90, 90

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythro.	M. E. /ml Ery. Vol.
2	7,500	681,75	184.257	27.252
3	6,363	578,40	136.630	22.216
4	7,000	636,30	180.086	29.390
5	8,750	795,38	219,923	32.417
6	9,639	876,19	226.600	34.715
8	10,000	909,09	219.945	34.597
9	8,750	795,38	230.115	37.969
10	5,714	519,40	156.604	24.164
11	5,385	489,50	150.614	22.773
12	8,571	779,10	271.781	45.768
14	10,000	909,09	199.327	33.048
Mittelwert $\bar{x}$			197.807	31.301
Standardabweichung s			$40.610 \hat{=} 20,53\%$	$7.120 \hat{=} 22,7\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			12.244	2.147

Tabelle 14 geschützte Tiere

Tierzahl $n_1 = 12$; Faktor $F 1 = 90,90$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythro.	M. E. /ml Ery. Vol.
22	5,833	530,22	150.773	23.340
23	8,333	757,47	212.372	35.551
24	5,833	530,22	239.198	38.056
25	11,429	1038,90	216.434	35.365
26	8,889	808,01	259.258	40.289
27	11,250	1022,63	328.121	53.681
28	8,333	757,47	226.112	40.022
29	9,411	855,46	291.635	45.320
30	8,889	808,01	312.773	47.041
31	8,889	808,01	247.348	38.982
34	10,000	909,09	267.382	55.883
35	8,333	757,47	243.042	39.519
Mittelwert $\bar{x}$			249.537	41.987
Standardabweichung s			47.952 $\hat{=} 19,2\%$	8.671 $\hat{=} 21,1\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			13.859	2.506

Der Signifikanztest nach STUDENT erbrachte folgende Ergebnisse:

a) bei Berechnung pro 10^{11} Erythrozyten:

$$t = 2,7782; p \text{ zwischen } 0,01 - 0,005$$

b) bei Berechnung pro ml Erythrozytenvolumen:

$$t = 2,9414; p \text{ zwischen } 0,005 - 0,0025$$

Die Ergebnisse werden in den graphischen Darstellungen Nr. 7 und Nr. 8 veranschaulicht.

TIM - TEST

Graph. Darstell. 7

Milli E./10⁴ Zellen

mit Vit. D geschützte Gruppe

$$\bar{x} = 249.537$$

$$s = 47.952$$

$$s\bar{x} = 13.859$$

experimentell nachitische Gruppe

$$\bar{x} = 197.807$$

$$s = 40.610$$

$$s\bar{x} = 12.244$$

Statistik:

$$t = 2,7782$$

$$p \rightarrow 0,01 - 0,005$$

$$n_1 = 12$$

$$n_2 = 11$$

Graph. Darstell. 8

Milli E./ml Zellvolumen

mit Vit. D geschützte Gruppe

$$\bar{x} = 41.082$$

$$s = 8.671$$

$$s\bar{x} = 2.506$$

experimentell nachitische Gruppe

$$\bar{x} = 37.307$$

$$s = 7.120$$

$$s\bar{x} = 2.147$$

Statistik:

$$t = 2,9474$$

$$p \rightarrow 0,005 - 0,0025$$

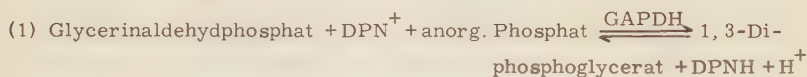
$$n_1 = 12$$

$$n_2 = 11$$

Der GLYCERINALDEHYDPHOSPHAT-DEHYDROGENASE - Test

Mit der von dem Enzym Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase gesteuerten Reaktion gelangt der Phosphoglycerinaldehyd durch phosphorylierende Oxydation, wobei anorganisches Phosphat in organische Bindung übergeführt wird, aus dem metabolischen Pool $\text{DAP} \rightleftharpoons \text{GAP}$ in den weiteren Abbau.

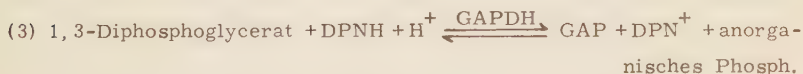
Die Reaktion entspricht der Gleichung:



Die Aktivitätsbestimmung gelingt im zusammengesetzten optischen Test nach BEISENHERZ, BÜCHER et al. (5) im sogenannten "Rückwärtstest".

Analoge Testansätze finden sich bei LÖHR und WALLER (64, 65), POWELL und BREWER (47) und anderen Autoren. Eine ältere Bestimmungsmethode ist der "Vorwärtstest" mit Arseniat nach WARBURG und CHRISTIAN (66).

Die Bestimmung im Rückwärtstest wird gemäß der Reaktionsgleichungen



durchgeführt.

Da nach RACKER (53) und HOLZER (30) die SH - Gruppen der GAPDH an dem Reaktionsmechanismus beteiligt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Testbestimmung unter Zusatz von reduziertem Glutathion neben einer Testbestimmung ohne Glutathion durchgeführt.

Eine ausführliche Literaturzusammenstellung findet man wiederum in den Biochemica Informationen von C. F. Boehringer.

A. Bestimmung unter Zusatz von reduziertem Glutathion

<u>Testansatz</u>	Küvettenvolumen 3 ml		
Reihenfolge	Konzentration	Molarität	Menge im Test
2,20 ml TRAP $p_H = 7,6$	---	$5,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	---
0,25 ml GSH in TRAP	2 mg/ml	$0,65 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$1,63 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,05 ml EDTA	10 mg/ml	$2,69 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$1,35 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,04 ml MgSO_4	123,25 mg/ml	$5,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$	$2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol}$
0,01 ml PGK	2 mg/ml	---	$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mg}^{\Delta}$
0,10 ml 3-PG-Cyclo- hexylammoni- umsalz	50 mg/ml	$9,3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$9,3 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$ 3,6 M. E
0,10 ml DPNH	10 mg/ml	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
Start			
0,05 ml ATP	10 mg/ml	$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$3,96 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
3,00 ml			

Ergebnisse der optischen Aktivitätsmessung des Fermentes GAPDH
unter Zusatz von reduziertem Glutathion.

Tabelle 15 experimentell rachitische Tiere
Tierzahl $n_2 = 12$; Faktor $F 1 = 18, 18$

Nr.	$\Delta E / \text{min}$	M. E. / ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythro.	M. E. / ml Ery. Vol.
1	38,333	696,89	250.378	41.713
2	27,142	493,44	133.362	19.724
3	26,667	484,81	114.522	18.621
4	22,500	409,05	115.769	18.893
5	40,000	727,20	201.071	29.638
6	40,000	727,20	188.068	28.812
8	57,142	1038,84	251.337	39.535
9	27,142	493,44	149.527	24.672
10	37,143	675,26	203.598	31.415
11	33,750	613,58	188.792	28.545
12	24,444	444,39	155.021	26.106
14	42,500	772,65	225.042	37.312
Mittelwert $\bar{x}$			181.374	28.749
Standardabweichung s			$47.989 \hat{=} 26,5\%$	$7.807 \hat{=} 27,2\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			13.870	2.256

Tabelle 16

geschützte Tiere

Tierzahl $n_1 = 12$; Faktor $F_1 = 18, 18$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythro.	M. E. /ml Ery. Vol.
22	40,000	727,20	206.787	32.011
23	29,230	530,00	148.596	24.875
24	14,166	257,54	116.184	18.485
25	51,000	927,18	193.159	31.562
26	30,667	557,53	178.889	27.799
27	47,000	854,46	274.162	44.853
28	42,857	779,14	232.581	41.167
29	34,000	618,12	210.061	32.746
30	25,454	462,75	179.126	26.941
31	31.538	573,36	175.517	27.661
34	39.285	714,20	210.061	43.903
35	38.750	704,48	226.039	36.754
Mittelwert $\bar{x}$			195.985	32.396
Standardabweichung s			$41.014 \hat{=} 20,9\%$	$8.570 \hat{=} 26,4\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			11.854	2.477

Der Signifikanztest nach STUDENT ergibt für

a) die Berechnung pro 10^{11} Erythrozyten

$$t = 0,8018; \text{ p zwischen } 0,25 - 0,20$$

b) die Berechnung pro ml Erythrozytenvolumen

$$t = 1,089; \text{ p zwischen } 0,15 - 0,10$$

Die große Streuung der Ergebnisse dieses Testes dürfte an der Brauchbarkeit der zugesetzten Lösung von reduziertem Glutathion liegen, da anfänglich nicht täglich frisch angesetzt wurde. Wesentlich exaktere Ergebnisse bringt deshalb der folgende Test ohne GSH - Zusatz, wobei das zugesetzte EDTA eine gewisse protektive Rolle spielt, weil dadurch eine Bindung von störenden Schwermetallionen in EDTA-Ionen-Komplexen erfolgt.

Die Ergebnisse sind in den graphischen Darstellungen Nr. 9 und Nr. 10 veranschaulicht.

GAPDH-TEST mit GSH

Graph. Darstell. 9

A Milli.E./10⁴ Zellen

mit Vit. D geschützte Gruppe

$$\bar{x} = 195,985$$

$$s = 41,014$$

$$s_{\bar{x}} = 11,854$$

experimentell rechtliche Gruppe

$$\bar{x} = 181,374$$

$$s = 47,989$$

$$s_{\bar{x}} = 13,870$$

Statistik:

$$t = 0,8018$$

$$p \rightarrow 0,25 - 0,20$$

n₁ = 12

n₂ = 12

Graph. Darstell. 10

A Milli.E./ml Zellvolumen

mit Vit. D geschützte Gruppe

$$\bar{x} = 32,396$$

$$s = 8,570$$

$$s_{\bar{x}} = 2,477$$

experimentell rechtliche Gruppe

$$\bar{x} = 28,749$$

$$s = 7,807$$

$$s_{\bar{x}} = 2,256$$

Statistik:

$$t = 1,089$$

$$p \rightarrow 0,15 - 0,10$$

n₁ = 12

n₂ = 12

B. Versuch ohne Zusatz von reduziertem Glutathion

<u>Testansatz</u>	Küvettenvolumen 3 ml		
Reihenfolge	Konzentration der Lösungen	Molarität der Lösungen	Menge der Substanz im Testvolumen
2,45 ml TRAP $p_H = 7,6$	---	$5,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	---
0,05 ml EDTA	10 mg/ml	$2,69 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$1,35 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,04 ml MgSO_4	123,25mg/ml	$5,0 \cdot 10^{-1} \text{ M}$	$2,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol}$
0,01 ml PGK	2 mg/ml	---	$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ mg} \overset{\Delta}{=} 3,6 \text{ M. E.}$
0,10 ml 3-PG-Cyclo- hexylammoni- umsalz	50 mg/ml	$9,3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$9,3 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,10 ml DPNH	10 mg/ml	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$1,5 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
0,05 ml HämolySAT			
Start			
0,20 ml ATP	10 mg/ml	$2,0 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$3,96 \cdot 10^{-6} \text{ Mol}$
3,00 ml			

Ergebnisse der optischen Aktivitätsmessung des Enzyms GAPDH ohne
GSH - Zusatz

Tabelle 17 experimentell rachitische Tiere
Tierzahl $n_2 = 12$; Faktor $F 1 = 18,18$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E. /ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythrozyt.	M. E. /ml Ery. Vol.
1	26,667	484,80	174,179	29,018
2	23,333	424,19	114,646	16,956
3	23,333	424,19	100,202	16,293
4	22,000	399,99	113,205	18,475
5	34,000	618,20	170,932	25,195
6	33,333	605,99	156,721	24,009
8	38,000	690,84	167,142	26,291
9	27,000	490,86	148,745	24,543
10	32,500	590,85	178,147	27,488
11	31,111	565,60	174,029	26,313
12	17,500	315,15	109,937	18,513
14	32,857	597,34	173,981	28,646
Mittelwert $\bar{x}$			148,489	23,495
Standardabweichung s			$30,105 \hat{=} 20,3\%$	$4,668 \hat{=} 19,9\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			8,701	1,349

Tabelle 18

geschützte Tiere

Tierzahl $n_1 = 12$; Faktor $F 1 = 18, \overline{18}$

Nr.	$\Delta E/\text{min}$	M. E./ml Häm.	M. E. / 10^{11} Erythrozyt.	M. E. /ml Ery. Vol.
22	39,000	709,02	201.617	31.210
23	30,000	545,40	152.914	25.598
24	12,500	227,25	102.519	16.311
25	47,500	863,55	179.903	29.396
26	29,091	528,87	169.693	26.370
27	27,272	495,80	159.082	26.026
28	35,000	636,60	190.031	33.435
29	28,571	519,42	177.075	27.517
30	21,667	393,91	152.479	22.333
31	25,000	454,50	139.132	21.927
34	33,333	605,99	178.288	37.262
35	34,290	623,39	200.021	32.523
Mittelwert $\bar{x}$			166.896	27.542
Standardabweichung s			$28.007 \hat{=} 16,8\%$	$5.707 \hat{=} 20,7\%$
Standardabweichung des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$			8.095	1.649

Der Signifikanztest nach STUDENT ergibt für

a) die Berechnung pro 10^{11} Erythrozyten

$t = 1,729$; p zwischen $0,05 - 0,025$

b) die Berechnung pro ml Erythrozytenvolumen

$t = 2,2636$; p zwischen $0,025 - 0,0125$

Die Ergebnisse dieses Testes sind in den graphischen Darstellungen Nr. 11 und Nr. 12 veranschaulicht.

GAPDH-TEST ohne GSH

Graph. Darstell. 11

A Mill. E. / 10⁴ Zellen

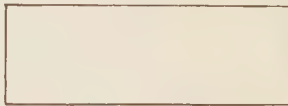
mit Vit. D geschützte Gruppe

$\bar{x} = 166.896$
 $s = 28.007$
 $s_x = 8.095$

experimentell rachitische Gruppe

$\bar{x} = 148.489$
 $s = 30.105$
 $s_x = 8.701$

140.000
120.000
100.000
80.000
60.000
40.000



Statistik:

$t = 1,729$
 $p \rightarrow 0,05 - 0,025$

$n_1 = 12$

$n_2 = 12$

Graph. Darstell. 12

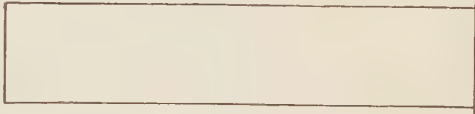
A Mill. E. / ml Zellvolumen

mit Vit. D. geschützte Gruppe

$\bar{x} = 27.542$
 $s = 5.707$
 $s_x = 1.649$

experimentell rachitische Gruppe

$\bar{x} = 23.495$
 $s = 4.668$
 $s_x = 1.349$



Statistik:

$t = 2,2636$
 $p \rightarrow 0,025 - 0,0125$

$n_1 = 12$

$n_2 = 12$

Zusammenstellung der Ergebnisse der Aktivitätsmessungen

In der Tabelle 19

werden die Mittelwerte pro 10^{11} Zellen und pro ml Zellvolumen, die Standardabweichungen s (in %), das prozentuale Aktivitätsdefizit in Bezug auf die geschützten Tiere und die Signifikanzprüfung der Aktivitätsunterschiede im STUDENT - Test (in t und p) wiedergegeben.

Enzym	Hexokinase		G-6-PDH		FDP-Aldolase	
Berechnung pro	M. E. / 10^{11}	M. E. / ml	M. E. / 10^{11}	M. E. / ml	M. E. / 10^{11}	M. E. / ml
Geschützte Tiere	1. 576	260	25. 186	4. 138	4. 174	678
s in %	29, 5%	26, 9%	14, 1%	13, 0%	17, 5%	22, 1%
Rachitische Tiere	1. 534	243	21. 354	3. 385	3. 517	557
s in %	24, 9%	24, 4%	16, 2%	15, 7%	20, 1%	20, 0%
Aktivitätsdefizit						
in %	2, 7%	6, 5%	15, 21%	18, 2%	15, 7%	17, 9%
t	0, 2570	0, 9336	2, 8364	3, 2677	1. 9643	2, 5695
p	0, 40 -	0, 20 -	0, 005 -	0, 0025 -	0, 05 -	0, 01 -
	0, 35	0, 15	0, 0025	0, 0005	0, 025	0, 005

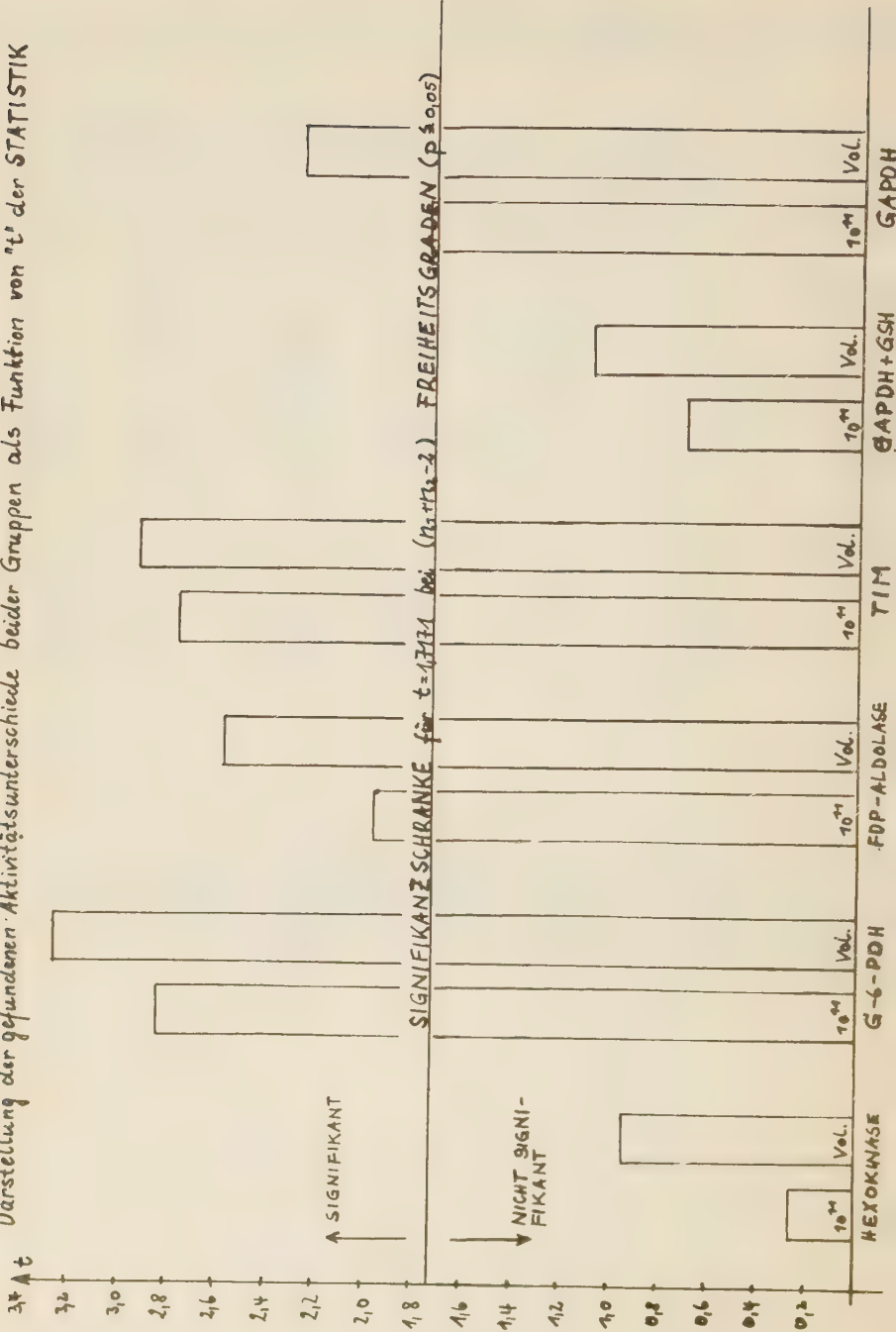
Fortsetzung der Tabelle 19

Enzym	Trioseisome- rase		GAPDH		GAPDH + GSH	
Berech- nung	M. E. / 10 ¹¹	M. E. / ml	M. E. / 10 ¹¹	M. E. / ml	M. E. / 10 ¹¹	M. E. / ml
geschützte Tiere	249.537	41.087	166.896	27.542	195.985	32.396
s in %	19,2%	21,1%	16,8%	20,7%	20,9%	26,4%
rachitische Tiere	197.807	31.301	148.489	23.495	181.374	28.749
s in %	20,53%	22,7%	20,3%	19,9%	26,5%	27,2%
Aktivi- tätsdefizit						
in %	21,2%	23,5%	11,0%	14,7%	7,5%	11,3%
t	2,7782	2,9414	1,7291	2,2636	0,8018	1,0896
p	0,01 - 0,005	0,005 - 0,0025	0,05 - 0,025	0,025 - 0,0125	0,25 - 0,20	0,15 - 0,10

Eine statistische Signifikanz der Unterschiede in den Enzymaktivitäten der beiden Versuchsgruppen wird für $p \leq 0,05$ angenommen. Die gefundenen Unterschiede werden in der folgenden graphischen Darstellung in Bezug auf die Signifikanzschränke wiedergegeben.

Graph. Darstellung 13

Darstellung der gefundenen Aktivitätsunterschiede beider Gruppen als Funktion von t der STATISTIK



DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität verschiedener Enzyme des glykolytischen Kohlehydratabbaues in Erythrozyten normaler und experimentell rachitischer Ratten untersucht.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß diese Aktivitäten in vitro nach Hämolyse gemessen wurden. Die Ergebnisse, berechnet in M. E. / 10^{11} Zellen bzw. M. E. / ml Erythrozytenvolumen, können daher nicht als die tatsächlich in der Zelle wirksamen Aktivitäten angesehen werden. Die gefundenen Enzymaktivitätswerte der Hämolysate sind nicht ohne weiteres auf die Zelle in vivo übertragbar. Sie sind deshalb zunächst als Mengenangabe für in der Zelle vorhandenes Enzymeiweiß anzusehen. In der intakten Zelle beeinflussen sicher Faktoren, die in den Testzusammensetzungen nicht vorhanden waren, die Aktivität der Fermente. Insbesondere muß man hier an intrazelluläre Aktivatoren und an kompetitive Hemmung durch Substrate denken.

Das Ergebnis der Untersuchungen zeigt, daß die Aktivität der Enzyme G-6-PDH, FDP-ALDOLASE, TIM und GAPDH um 14 bis 23 % in Erythrozyten bei experimenteller Rachitis herabgesetzt ist. Die Unterschiede konnten durch den "t - Test" nach STUDENT statistisch gesichert werden. Die Hexokinase zeigte im Mittel ebenfalls eine leichte Erniedrigung der Aktivität um 6,5 % bei den rachitischen Tieren. Eine statistische Sicherung war jedoch nicht möglich.

Verminderungen bestimmter Enzymaktivitäten sind in den letzten Jahren im Hinblick auf den Vorgang der Zellalterung von Erythrozyten diskutiert worden. Hierbei wurden besonders die G-6-PDH, GAPDH und die Hexokinase von LÖHR und WALLER (41), POWELL und BREWER (47, 14) sowie BISHOP (11) als Schrittmacherenzyme des Kohlehydratstoffwechsels beachtet. Falls solche Enzyme vermindert sind, lassen sich metabolische Veränderungen, wie Verringerung des Gesamtglukoseumsatzes und Senkung des ATP-Spiegels und damit Beeinträchtigung der Lebensdauer der Erythrozyten schlüssig erklären.

Eine Stütze für die Richtigkeit dieser Ansichten sind die Kenntnisse von angeborenen und erworbenen Enzymmangelzuständen und den dabei auftretenden hämolytischen Krisen infolge einer verkürzten Lebensdauer der roten Blutzellen.

Das völlige Fehlen bzw. die völlige Hemmung der G-6-PDH durch das Fehlen oder die Hemmung eines noch unbekannten intrazellulären Aktivators für dieses Enzym, sind als "inborn error of metabolism" bei hereditären hämolytischen Anämien bekannt, LÖHR und WALLER (65, 42).

In anderen Fällen wurden bei Behandlung mit bestimmten Medikamenten und bei Ernährung mit bestimmten Nahrungsmitteln hämolytische Krisen beobachtet, die ebenfalls mit einem Mangel bzw. Fehlen an G-6-PDH - Aktivität in den Erythrozyten einhergingen, wie CARSON et al. (18, 19), SZEINBERG et al. (62), LARRIZA et al. (39) und SANSONE (46) berichten. Eine Zusammenstellung findet sich in den Biochemica Informationen (12).

Im Hinblick auf die in der Literatur beschriebene verkürzte Lebenszeit der roten Blutkörperchen rachitischer Lebewesen erscheint die statistisch gut gesicherte Herabsetzung der Aktivität des Enzyms G-6-PDH interessant. Die im Abschnitt III₃ angeführten Stoffwechselschemata zeigen, welche Schlüsselposition die G-6-PDH am Abgang des Hexose-Monophosphat-Shunts mit TPN als Wasserstoffakzeptor inne hat.

Eine Verminderung der mittleren Lebensdauer bedeutet eine vorzeitige Alterung mit vorzeitiger Hämolyse. Die enge Verknüpfung der G-6-PDH und der GAPDH mit dem Hämoglobin-Reduktase-System, auf die in Abschnitt III₃ eingegangen wurde, läßt folgende Überlegung zu:

Da die Funktionsfähigkeit eines Erythrozyten an ein intaktes Hämoglobin-Reduktase-System gebunden ist, können eine vorzeitige Abnahme der Aktivität bestimmter Enzyme oder auch eine Minderausstattung an Fermenten Ursachen für eine herabgesetzte Lebenszeit der roten Blutzellen sein.

Die Hämolysate, aus denen die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse gewonnen wurden, stellen Extrakte aller in der betreffenden Zellpopulation

vorkommenden Erythrozyten dar. Es wurde also keine Aufteilung in jüngere und ältere Zellen vorgenommen. Damit sind die Ergebnisse auch nur Ausdruck eines Mittelwertes der Aktivitäten von jüngeren und älteren Zellen. Die Erniedrigung der Aktivität der Enzyme G-6-PDH und GAPDH, LÖHR und WALLER (41), sowie G-6-PDH und Hexokinase, BREWER und POWELL (47, 14), in alternden Zellen ist beschrieben. Die Differenzierung in alte und junge Zellen ist dabei auf verschiedene Weise erzielt worden. Die Differentialagglutination (LÖHR und WALLER) von Erythrozyten der Blutgruppe 0 in Empfängern der Blutgruppe A bereitet experimentell große Schwierigkeiten. Deshalb ist zumeist eine Trennung von Erythrozyten möglichst großen Altersunterschiedes mittels der Dichtegradienten-Zentrifugation vorgenommen worden. Es werden dabei eine obere Schicht mit Zellen von relativ niedrigem spezifischen Gewicht, und eine untere Schicht mit Zellen relativ hohen spezifischen Gewichtes gewonnen. Die obere Schicht enthält in Anreicherung Retikulozyten und wird daher als der junge Teil der Population angesehen. Das Prinzip dieser Trennung in junge und alte Zellen setzt eine lineare Zunahme der Erythrozytendichte im Verlauf der Alterung voraus. Diese Arbeitshypothese hat aber bislang noch keine experimentelle Sicherung erfahren. Sie wird jedoch allgemein als gegeben angenommen.

Mit letzterer Methode haben POWELL und BREWER (14) in normalen menschlichen Blutproben Unterschiede in der Aktivität von Hexokinase und G-6-PDH zwischen jungen und alten Zellen gefunden.

Für einen Vergleich dieser Ergebnisse mit den an der Gesamtpopulation gefundenen Aktivitätsveränderungen der vorliegenden Arbeit fehlt bei BREWER und POWELL die Angabe der Aktivität der Gesamtpopulation, für die man nur in Annäherung den Mittelwert aus den beiden angegebenen einsetzen kann. Dabei läßt sich ein Unterschied zwischen alten Zellen und Gesamtzellzahl von 18 % für Hexokinase und von 21 % für G-6-PDH errechnen.

Da bei der Rachitis die Retikulozytenzahl im Vergleich zu normalem Blut zwar signifikant, aber nicht wesentlich erhöht ist (25), andererseits aber

bei Anwendung der Dichtegradienten-Zentrifugation die retikulozytenangereicherte obere Schicht in die Mittelwertberechnung eingeht und dadurch der hohe Mittelwert bedingt wird, weil Retikulozyten, wenn sie vollwertig sind, sehr enzymreich sind, erscheinen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, selbst die des Hexokinase-Tests, im Sinne eines Alterungsprozesses durchaus diskutabel.

Damit weisen auch die Ergebnisse früherer Untersuchungen an Erythrozyten solcher Versuchstiere in diese Richtung, denn GARBE (25) fand eine Anhäufung der Intermediärprodukte Fruktose-1, 6-diphosphat und Triosephosphat. Die hier angreifenden Enzyme Aldolase, TIM und GAPDH zeigen eine statistisch gesicherte Aktivitätsminderung.

Alle Befunde über den Stoffwechsel von Erythrozyten rachitischer Lebewesen lassen sich deshalb bisher am besten als Folgen einer vorzeitigen Alterung der roten Blutzellen verstehen. Zu denken wäre aber auch an eventuelle morphologische Veränderungen der Zellmembran von Erythrozyten bei den bestehenden blutchemischen Veränderungen rachitischer Lebewesen. Dabei könnte die Erythrozytenmembran eine veränderte Durchlässigkeit haben, womit ein sekundärer Verlust an Fermentaktivität durch Herausdiffusion nicht strukturgebundener Enzyme, eine Änderung des intrazellulären Milieus, oder aber auch der Einstrom von Fermentinhibitoren denkbar würden. Schließlich wäre auch das Enzymaktivitätsdefizit bei Rachitis aus einer mangelhaften Ausstattung der Erythrozyten mit aktivem Enzymeiweiß erklärlich.

Diese Fragen könnten vielleicht durch gezielte Untersuchung von Retikulozyten gesunder und rachitischer Versuchstiere geklärt werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit diente der Aktivitätsbestimmung bestimmter Enzyme der Glykolyse in Erythrozyten experimentell rachitischer Ratten. In zwei Vergleichsreihen wurden die Enzyme Hexokinase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Aldolase, Triosephosphatisomerase und Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase bestimmt.

Es wird allgemein auf die Problemstellung und die bisher vorliegenden Ergebnisse von Stoffwechseluntersuchungen bei Rachitis eingegangen. Anschließend werden Meßtechnik und Berechnungsverfahren beschrieben. Haltung, Pflege und Ernährung der Tiere werden erklärt, die Gewinnung und Aufarbeitung des Blutes werden erläutert.

Abschließend wird auf alle Bestimmungen, Testansätze, Messungen und Ergebnisse eingegangen. Die Ergebnisse werden tabellarisch und graphisch dargestellt. Tabelle 19 gibt eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen.

ERGEBNIS

Bei allen untersuchten Enzymen zeigten sich mehr oder weniger deutliche Unterschiede in der Aktivität zwischen der Gruppe gesunder Ratten und der Gruppe experimentell rachitischer Ratten.

Statistisch signifikante Unterschiede (für $p \leq 0,05$) ergaben sich

a) bei Berechnung pro 10^{11} Zellen für:

G-6-PDH, ALD, TIM, GAPDH ohne Zusatz von reduziertem Glutathion

b) bei Berechnung pro Milliliter Erythrozytenvolumen für:

G-6-PDH, ALD, TIM, GAPDH ohne Zusatz von reduziertem Glutathion.

Aus den gefundenen Werten lassen sich vermutliche Erklärungen für die in der Literatur beschriebene Anhäufung von Intermediärprodukten der

Glykolyse in Erythrozyten experimentell rachitischer Versuchstiere
und für die herabgesetzte mittlere Lebensdauer der roten Blutzellen
solcher Tiere herleiten.

Meinem verehrten Doktorvater,

Herrn Professor Dr. med. J. Ströder

Direktor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg

bin ich in Dankbarkeit für die Themastellung und die
Übernahme des Referates verbunden.

Bei Herrn Dr. rer. nat. A. Garbe, seinerzeit wissenschaftlicher Assistent der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, möchte ich mich hier für seine stets gerne gewährte Hilfe in theoretischen und praktischen Fragen bedanken.

II

16. BRUNS, F. Biochem. Z., 325, 432, (1954)
17. BÜCHNER, F. Allgemeine Pathologie (1962)
18. CARSON, P. E. Science, 124, 484, (1956)
19. CARSON, P. E. J. Lab. Clin. Med., 51, 600, (1958)
20. COOPER, I., Arch. Bioch. Biophys., 74, 306, (1958)
P. A. SRERE u. a.
21. DOCUMENTA GEIGY Wiss. Tabellen, 6. Auflage
22. DOOSE, H. Z. ges. exp. Med., 134, 73, (1969)
23. FISKE, C. H. und J. Biol. Chem., 66, 375, (1925)
Y. SUBBAROW
24. FREUDENBERG, E. und Z. Kinderheilk., 41, 466, (1926)
A. WELCKER
25. GARBE, A. und Z. physiol. Chem., 333, 127, (1963)
J. STRÖDER
26. GARBE, A. pers. Mitteil., Univ. Ki. Kli. Würzburg
27. HANOWSKY, P. pers. Mitteil., Univers. Ki. Kli. Würzburg
28. HARRISON, H. E. und Jale J. Biol. Med., 24, 273, (1952)
H. C. HARRISON
29. HEILMEYER, L. Lehrbuch der speziellen pathologischen
Physiologie (1955)
30. HOLZER, H. und Z. Physiol. Chem., 291, 67, (1952)
E. HOLZER
31. IVERSEN-LENSTRUP, P. L. Norsk. Paediat. -Kongress (1919)

III

32. JONXIS, I. H. P. Helv. Paed. Acta, 10, 245, (1955)
33. KIESE, M. Biochem. Z., 316, 264, (1944)
34. KODICEK, E. Proceedings of the Fourth International
Congress of Biochemistry, Wien 1958, Vol. XI,
S. 198
35. KOLB, H. pers.Mitteil., Univ.Ki.Kli. Würzburg
36. KORNBURG, B. und in COLOWICK u. KAPLAN "Methode in
B.L. HORECKER encymology", Vol. 1, 323, (1955)
37. KRINBERG, D. V. Am. J. Physiol., 200, 1252, (1961)
D. SCHACHTER u.a.
38. LANDSBERGER, M. Z. Kinderheilk., 39, 597, (1925)
39. LARRIZA, P. Haematologica, 43, 205, (1958)
40. LEUTHARDT, F. Lehrbuch der physiolog.Chemie (1961)
41. LÖHR, G.W. und Klin. Wschr., 36, 1008, (1958)
H.D. WALLER
42. LÖHR, G.W. und Kli.Wo., 36, 865, (1958)
H.D. WALLER
43. Mc COLLUM, E.V., Am. J. of Med., Dez. 1959
N. SIMMONDS u.a.
44. MICHAL, G. pers.Mitteil., bei C.F. Boehringer
45. NITSCHKE, A. und Z. Kinderheilk., 54, 1, (1933)
M. SCHNEIDER
46. PENA, I., Revista Espanola Pediatria, Tomo XX,
M. CERQUERO u.a. 115, 15, (1964)

47. POWELL, D. und I. BREWER Klin. Wschr., 41, 200, (1963)
48. PRANKERD, T. A. J. The Red Cell, 1961, Blackwell Scientific Publ., Oxford
49. PRANKERD, T. A. J. Progress of Hematology, Vol. 3, Herausgeber L. M. TOCANTIS
50. RACKER, E. Arch. Biochem. Biophys., 74, 306, (1958)
51. RACKER, E. J. Biol. Chem., 167, 843, (1947)
52. RACKER, E. J. Biol. Chem., 167, 843, (1953)
53. RACKER, E. J. Biol. Chem., 198, 731, (1952)
54. RAPOPORT, S. und G. M. GUEST J. Biol. Chem., 126, 749, (1939)
55. RAPOPORT, S. und G. M. GUEST Am. J. Diseas. Child., 58, 1072, (1939)
56. ROBISON, R. Biochem., J., 17, 286, (1923)
57. SANSONE, G. und G. SEGNI Boll. Soc. ital. Biol. sper., 34, 327, (1958)
58. SCHACHTER, D. und S. M. ROSEN Am. J. Physiol., 196, 357, (1959)
59. SCHMIDT, E. und F. W. SCHMIDT Enzymol. Biol. Clin., 4, Vol. 2, 201, (1962)
60. STEENBOCK, A. und S. A. BELLIN J. Biol. Chem., 205, 985, (1953)
61. STRÖDER, J., H. ZEISEL und E. MÜLLER Münch. Med. Wo. 36 u. 37, 1707 bzw. 1728, (1960)
62. SZEINBERG, A. Blood, 12, 601, (1957)

63. TRAUTSCHOLD, J. Dipl. Arbeit, TH München, (1956)
64. WALLER, H. D. und G. W. LÖHR Klin. Wschr., 35, 871, (1957)
65. WALLER, H. D. und G. W. LÖHR Klin. Wschr., 35, 1022, (1957)
66. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN Biochem. Z., 303, 40, (1939)
67. WARBURG, O. Wasserstoffübertragende Fermente, Verlag Dr. Saenger, Berlin, (1948)
68. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN Biochem. Z., 287, 291, (1936)
69. WARBURG, O. und W. CHRISTIAN Biochem. Z., 242, 206, (1931)
70. WILHELM, G. Z. Kinderheilk., 84, 123, (1960)

LEBENS LAUF

Am 2. Januar 1940 kam ich, Hans-Olaf Gartzke, in Straubing als Sohn des damaligen Reichsbankinspektors Werner Gartzke und seiner Ehefrau Erna, geborene Seidlitz, zur Welt.

Ich bin evangelisch-lutherischer Konfession und deutscher Staatsbürger.

Durch dienstliche Versetzungen meines Vaters bedingt, ging ich in Straubing, Deggendorf und ab 1957 in Würzburg zur Schule. Hier bestand ich 1960 an der Röntgen-Oberrealschule Würzburg das Abitur.

Seit dem Wintersemester 1960/61 studiere ich an der Universität Würzburg Medizin. Nach dem Sommersemester 1961 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem Wintersemester 1962/63 die ärztliche Vorprüfung ab.

Im Anschluß an das Wintersemester 1965/66 bestand ich das medizinische Staatsexamen.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhielt.

Hans Olaf Gartzke

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10
Tel. 541 43